UNTERSUCHUNGEN ZUR INDUKTION DER PHENYLALANIN - AMMONIUM - LYASE IN GEWEBEKULTUREN VON HAPLOPAPPUS GRACILIS

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung

der Doktorwürde

vorgelegt dem

Fachbereich Biologie der Freien Universität Berlin

von

Heinz - Detlef Gregor

aus Berlin

1971

UNTERSUCHUNGEN ZUR INDUKTION DER PHENYLALANIN - AMMONIUM - LYASE IN GEWEBEKULTUREN VON HAPLOPAPPUS GRACILIS

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung

der Doktorwürde

vorgelegt dem

Fachbereich Biologie der Freien Universität Berlin

von

Heinz - Detlef Gregor

aus Berlin

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Referent : Prof. Dr. J. Reinert
2. Referent : Prof. Dr. Th. Eckardt
Tag der mündlichen Prüfung : 12.3. 1971

INHALT

	Seite
. EINLEITUNG	3
. MATERIAL UND METHODEN	6
. ERGEBNISSE	20
I. Versuche zur PAL-Bestimmung	
1. Ermittlung der optimalen Homogenisationsdauer	
2. Dünnschichtchromatographische Bestimmung der PAL-Aktivität	
3. Photometrische Bestimmung der PAL-Aktivität	
4. Wahl der Bezugsgrösse	
5. Reaktionsfähigkeit des Gewebes bei verschiedenen Temperaturen	
II. PAL-Aktivität und Anthocyansynthese in Gewebekulturen von Haplopappus gracilis	32
1. PAL-Aktivität in unbestrahltem verstrichenem Gewebe in Abhängigkeit von der Kulturdauer	
2. PAL-Aktivität und Anthoyangehalt von nicht verstrichenem Gewebe nach Bestrahlung mit Blaulicht	
3. Einfluss von chemischen und mechanischen Reizen sowie Blaulichtbestrahlung auf die PAL-Aktivität und Anthocyansynthese	
4. Einfluss von Blaulicht nach Induktion der PAL-Synthese	
5. PAL-Aktivität und Gehalt an Hydroxyzimtsäuren	
6. Einfluss von Hell- und Dunkelrot auf die PAL-Aktivität und die Anthocyansanthese	
7. Charakterisierung der PAL	
8. De-novo Enzymsynthese unter Einwirkung von Blaulicht	
9. Hemmung der PAL-Aktivität und Anthocyansynthese	
III. PAL-Aktivität und Anthocyansynthese in Suspensionskulturen von Haplopappus gracilis	62
. DISKUSSION	66
. ZUSAMMENFASSUNG	91
. LITERATURNACHWEIS	94

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547205_0046

BIOSYNTHESESCHEMA FÜR CYANIDIN

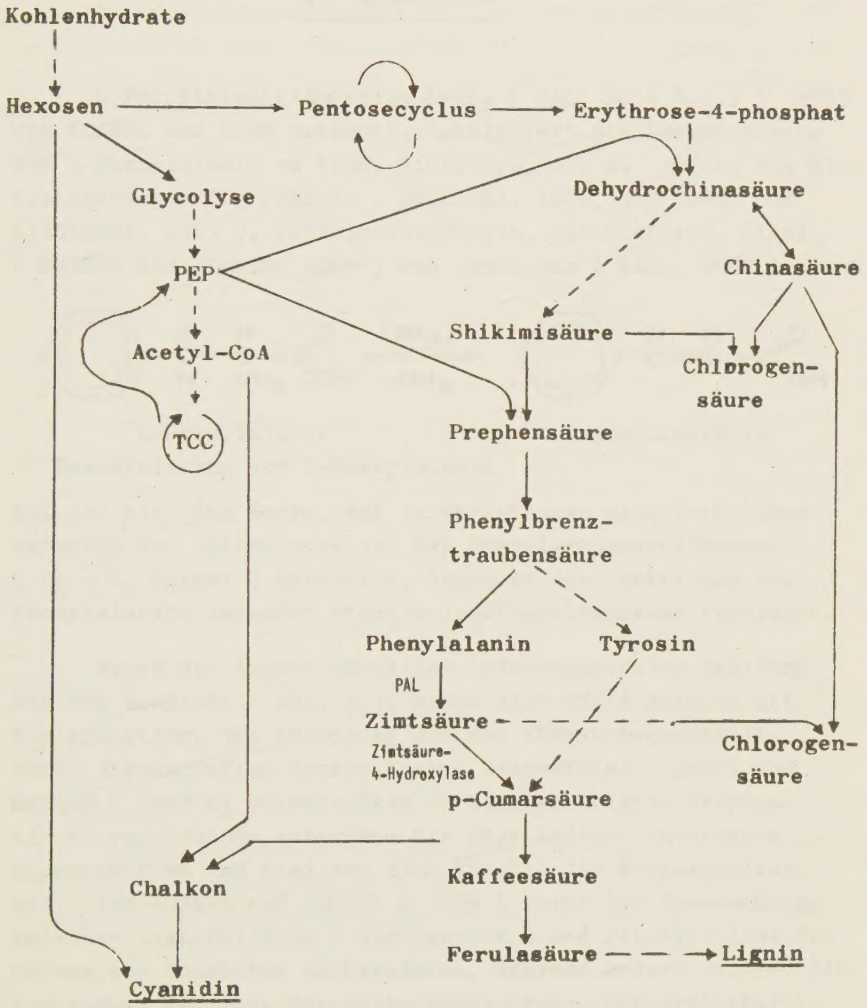
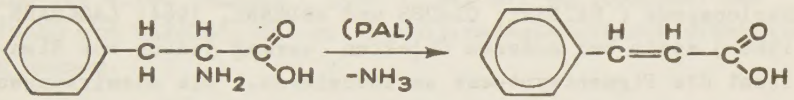


Abb.1 nach R. KANDELER (1960), C.C.LEVY u. M.ZUCKER (1960), K.R.HANSON u. M.ZUCKER (1963), O.GAMBORG (1966) und N.SUGANO u. K.HAYASHI (1967).

A. EINLEITUNG

L-Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL, EC 4.3.1.5), 1961 von KOUKOL und CONN entdeckt, katalysiert die Desaminierung von L-Phenylalanin zu trans-Zimtsäure, die am Anfang des Biosyntheseweges für Phenole (ENGELSMA, 1966, und DOWNS und SIEGELMAN, 1963), Phenolcarbonsäuren, Gallussäuren, Lignin (RUBERY und FOSKET, 1969) und Anthocyan (HESS, 1968) steht.



L-Phenylalanin trans-Zimtsäure

Desaminierung von L-Phenylalanin

PAL ist also das Enzym, das in der Pflanze eine Verbindung zwischen dem Aminosäure- und dem Phenylpropanstoffwechsel (C_6 - C_3 Körper) herstellt, indem es die Verteilung des Phenylalanins zwischen Protein- und Phenolsynthese reguliert.

Wegen der ausserordentlich bedeutungsvollen Stellung, die PAL einnimmt (Abb. 1), haben sich viele Autoren mit der Induktion, der Reinigung und den chemisch-physikalischen Eigenschaften dieses Enzyms beschäftigt. HAVIR und HANSON (1968 b) untersuchten an hochgereinigten Präparationen von Solanum tuberosum die physikalisch-chemischen Eigenschaften und stellten eine Kinetik der Enzymreaktion auf. Von RUBERY und FOSKET (1969) wurde der Zusammenhang zwischen Ligninbildung (=Xylogenese) und PAL-Aktivität für Coleus und Sojabohne nachgewiesen, während andere Autoren die Verbindung zwischen der Anthocyansynthese, der Syntheserate der Phenylpropanverbindungen und der PAL-Aktivität zu klären suchten. AMRHEIN und ZENK (1970 b) fanden bei Fagopyrumkeimlingen im Dunkeln eine eindeutige Korrelation zwischen PAL-Aktivität und der Akkumulation phenylpropanoider Verbindungen.

Andere Autoren untersuchten die Anthocyansynthese in Abhängigkeit vom Licht und stelltenfest, dass Licht verschiedener Qualität die Pigmentsynthese induzieren kann. Bei Rotkohl (SIEGELMAN und HENDRICKS, 1957), Buchweizen (MOHR und VAN NES, 1963), Sinapis (MOHR, 1957) und vielen anderen Objekten wurden die für die Anthocyansynthese wirksamen Bereiche des Spektrums im ultravioletten, blauen und roten Bereich gefunden und ein Einfluss des Phytochromsystems nachgewiesen. Bei Sorghum (DOWNS und SIEGELMAN, 1963) und Haplopappus (REINERT, CLAUSS und ARDENNE, 1964; LACKMANN, 1968) sowie bei anderen Objekten vermag jedoch nur Blaulicht die Pigmentsynthese zu induzieren. Die Auswirkungen von verschiedenen Temperaturen auf die Anthocyansynthese beobachteten SIEGELMAN und HENDRICKS (1958) bei Äpfeln, EBERHARDT (1954) und ENGELSMA (1970) bei Rotkohlkeimlingen und LACKMANN (1968) bei Haplopappus-Gewebekulturen. Die Reaktion auf chemische Veränderungen und die Folgen von Verwundung sind von MINAMIKAWA und URITANI (1964), EBERHARDT (1954) undZUCKER (1965) beschrieben worden.

Weitere Klarheit über den Biosyntheseweg des Anthocyans brachten die Versuche von SUGANO und HAYASHI (1967 a,b), die durch Applikation von markierten Substanzen an Karottenkulturen die Herkunft des Phosphoenolpyruvats im Shikimisäure-Phenylalaninsyntheseweg nachwiesen. Im Zusammenhang damit ermöglichten andere Ergebnisse (GAMBORG, 1966) nunmehr genauere Angaben über die Biosynthesewege der Phenylpropankörper, der Anthocyane und anderer phenolischer Verbindungen zu machen. (s. Biosyntheseschema, Abb. 1)

Da die Synthese von PAL und Zimtsäure-4-Hydroxylase bei vielen Objekten eine ähnliche Kinetik aufwies, wie die der Anthocyansynthese (DURST und MOHR, 1966a; ENGELSMA, 1967; AMRHEIN und ZENK, 1970 a), wurde in weiteren Arbeiten die PAL-Aktivität in Abhängigkeit von Faktoren untersucht, die schon zur Induktion von Anthocyan geführt hatten.

Bestrahlung mit Licht verschiedener Qualität (ZUCKER, 1965), mechanischer Reiz (ENGELSMA, 1968), chemische Reize (REID und MARSH, 1969) und Behandlung mit tiefen Temperaturen (ENGELSMA, 1969) beeinflussten die PAL-Aktivität. Als Objekte dienten vorwiegend Pflanzenteile (Kartoffelscheiben, Cucumis-Hypokotyle, Xanthiumblattstücke) oder Keimlinge von Sinapis alba.

Nur wenige Autoren arbeiteten mit Gewebekulturen. Hier sind vor allem GAMBORG (1966), der mit Haplopappus- und SUGANO und HAYASHI, die mit Karottengewebekulturen arbeiteten, zu nennen.

Die vorliegende Arbeit ist darauf ausgerichtet, an Kalli von Haplopappus gracilis die Möglichkeiten zur Induktion, Förderung und Hemmung der PAL-Synthese zu klären, sowie Beziehungen zur Zimtsäure-4-Hydroxylase, der Synthese von Hydroxyzimtsäuren und Anthocyan aufzustellen. Es werden zwei Methoden zur Bestimmung der PAL-Aktivität durchgeführt und quantitativ miteinander verglichen. Es soll geprüft werden, inwieweit Blaulicht, Hell- und Dunkelrotlicht sowie mechanische und chemische Reize die PAL-Aktivität zu beeinflussen vermögen. Anhand von Aktivitätsbestimmungen der Malat-Dehydroxygenase wird die Beteiligung zentraler Stoffwechselvorgänge an der Anthocyansynthese geprüft.

Für diese Untersuchungen wurden Haplopappus-Gewebekulturen auf Schrägagar (REINERT, CLAUSS, ARDENNE, 1964) und Suspensionskulturen (GAMBORG, 1966) herangezogen.

B. MATERIAL UND METHODEN

1. Untersuchungsobjekte

Als V e r s u c h s m a t e r i a l dienten Gewebekulturen (Kalli) aus dem Spross von Haplopappus gracilis, die seit 1961 in Kultur gehalten werden (REINERT und TORREY, 1961). Es wurden hauptsächlich Kulturen eines Stammes herangezogen, die auf White-Medium (REINERT und WHITE,1956) mit einem Zusatz von 2 % Saccharose, 0,6 % Agar und $5x10^{-9}$ g/l 2,4-D bei einem pH von 5,5 und bei 23° C im Dunkeln wuchsen. Das unter diesen Bedingungen völlig pigmentfreie Gewebe wurde alle 28 Tage auf frisches Nährmedium übertragen. Während der Sterilisation der Nährböden in den Kulturröhrchen bzw. Petrischalen im Autoklaven (1 atü, 120°, strömender Wasserdampf, 15 Minuten) sank der pH auf 5,2-5,3; nach der Kulturperiode von 28 Tagen war er bis auf 5-5,1 abgesunken.

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde 3 Wochen altes Gewebe ausgewählt, das gleichmässig weiss und weich war. Gewebe, das auf White-Medium mit Zusatz von IES (10^{-6} g/l) gehalten wurde, sowie in Medium nach MURASHIGE und SKOOG (1962) herangezogene Submerskulturen erwiesen sich für die vorliegenden Untersuchungen als weniger geeignet, da sie, was die Anthocyansynthese betrifft, hinter den oben genannten Kulturen zurückblieben. Da vorangegangene Arbeiten im Hause (REINERT, CLAUSS und ARDENNE, 1964; LACKMANN, 1968) sich hauptsächlich mit Kulturen auf White-Medium mit Zusatz von 2,4-D ($5x10^{-9}$ g/l) beschäftigten, war dies ein weiterer Grund, sich im Wesentlichen auf diese zu beziehen.

Die untersuchten S u s p e n s i o n s k u l t u r e n von Haplopappus gracilis stellte Dr. O. GAMBORG aus dem Prairie-Laboratorium Saskatoon/Saskatchewan zur Verfügung. Sie wurden in flüssigem B 5 Nährmedium nach GAMBORG mit bzw. ohne 2,4-D+ (Tabelle 1) bei 25° C im Dunkeln, bzw. in Weisslicht von 2000 lux (Osram 25/40 W Universal weiss, Abb. 2) gehalten. Der pH der Nährlösung veränderte sich durch die Sterilisation nicht, verschob sich jedoch innerhalb derKulturdauer von 10 Tagen bis fast zum Neutralpunkt (Tab. 2). In dieser Zeit betrug der Zuwachs 900 %.

Haplopappus neigt zum Braunwerden, und zwar ganz besonders bei erhöhten Temperaturen (bis 30° C). Daher wurde im Verlaufe der Arbeit darauf verzichtet, Versuche mit Gewebe bei 28° C weiterzuführen. Hierbei musste in Kauf genommen werden, dass bei 23° C gehaltene Kulturen naturgemäss langsam wuchsen (innerhalb einer Übertragungsperiode von 28 Tagen betrug der Zuwachs ca. 200 %), und dass die Versuche unterhalb der für die Anthocyansynthese optimalen Temperatur abliefen (LACKMANN, 1968). Die Reaktion auf verschiedene äussere Faktoren war jedoch bei verschiedenen Temperaturen fast gleich (s. Abb. 12).

Für die Kulturen standen K u l t u r r ä u m e (BBC) mit stufenlos regelbarer Temperatur zur Verfügung. Sie wurde auf 23° C bzw. 25° C (± 1°) eingestellt.

Für die Untersuchungen zur Induktion der PAL-Synthese wurde die Bestrahlung mit B l a u l i c h t in einer Klimatruhe durchgeführt, deren Temperatur auf 23° C (± 1°) eingestellt war. Über der Truhe waren Leuchtstoffröhren Philips TL 19 angebracht, die ein Emissionsmaximum bei 440 nm haben. Bei konstantem Abstand von der Lichtquelle wurde das Gewebe mit einer Intensität von 12 000 erg/cm^2sec bestrahlt. (Spektrale Energieverteilung siehe Abb. 3).

+ 2,4-D = 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure

Tabelle 1: Zusammensetzung des B 5 Mediums (GAMBORG, 1966) für Suspensions-Kulturen von Haplopappus gracilis

Substanz	mg/l Nährlösung	Substanz	Menge/l Nährlösung
$NaH_2PO_4.H_2O$	150	$MnSO_4.H_2O$	10 mg
KNO_3	2500	H_3BO_3	3 mg
$(NH_4)_2SO_4$	134	$ZnSO_4.7H_2O$	2 mg
$MgSO_4.7H_2O$	250	$Na_2MoO_4.2H_2O$	250 µg
$CaCl_2.2H_2O$	150	$CuSO_4$	25 µg
Eisen (Fe 138*)	28	$CoCl_2.6H_2O$	25 µg
Nicotinsäure	1	KJ	750 µg
Thiamin.HCl	10	Saccharose	20 g
Pyridoxin.HCl	1	2,4-D	1 mg
m-Inositol	100		

pH: 5,5 +) Sequestrene Fe 138 Fa. Geigy/Basel

Tabelle 2: pH im Nährmedium

	vor Autoklavieren	nach Autoklavieren	nach 10 Tagen
pH ohne 2,4-D	5,5 5,5	5,5 5,6	6,6 6,4
mit 2,4-D	5,5 5,5	5,5 5,5	6,4 6,8

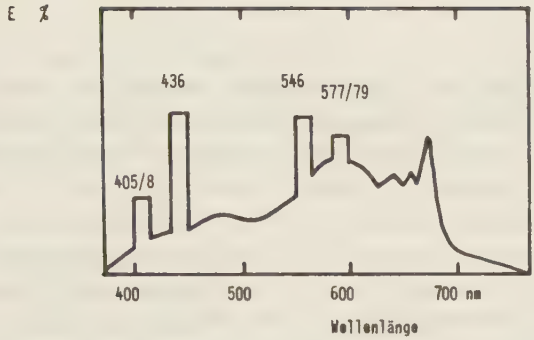


Abb. 2 : Spektrale Energieverteilung der Leuchtstoffröhren Osram 25 Universal-Weiss. (Originalangaben der Firma OSRAM)

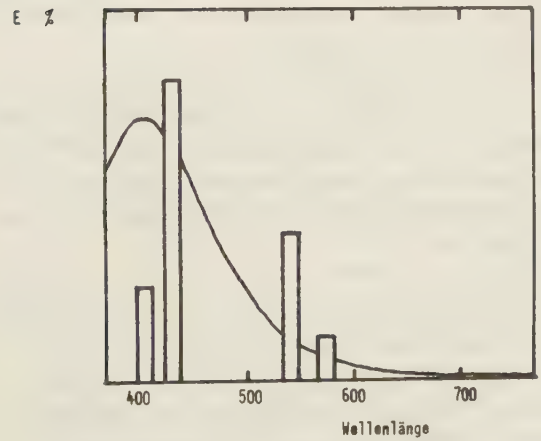


Abb. 3 : Spektrale Energieverteilung der Leuchtstoffröhren Philips TL 19 Blau. (Originalangaben der Firma PHILIPS)

2. Bestrahlung

Um die Bedeutung des Phytochromsystems für die PAL-Synthese zu untersuchen, musste das Gewebe mit kurz- und langwelligem R o t l i c h t bestrahlt werden. Für die Versuche mit Hellrot standen Leuchtstoffröhren Philips TL 15 40 W über Plexiglasfiltern Typ 501 rot (3 mm stark, Röhm & Haas, Darmstadt) zur Verfügung, die Dunkelrotbestrahlung erfolgte mit Hilfe von Osram Linestra 60 W-Leuchtstoffröhren, die mit einer Filterkombination (1 Wärmeabsorptionsglas Typ K G 3/ 2 mm, Schott & Gen., Mainz, 1 Plexiglas rot 501, 3 mm stark, 2 Platten Plexiglas blau 627, 3 mm stark (Plexiglas der Fa. Röhm & Haas, Darmstadt)) abgedeckt waren. Die Emissionsmaxima lagen bei 660 nm für Hellrot (Halbwertsbreite ca. 25 nm) und 740 nm für Dunkelrot (Halbwertsbreite ca. 100 nm), jedoch werden unterhalb 680 nm weniger als 0,1 % emittiert. (s. auch HARTMANN, 1970). Die Beleuchtungsintensitäten waren : für Hellrot 2600 erg/cm^2sec (700 lux) und Dunkelrot 2.000 erg/cm^2sec. Die Temperatur während der Bestrahlung betrug in beiden Fällen 23° C.

Die L i c h t i n t e n s i t ä t der Lichtquellen konnte bei Verwendung einer geeichten Thermosäule auf einem angeschlossenen Voltmeter abgelesen werden (1 µV = 25,5 erg/cm^2sec). Die Messung der Beleuchtungsstärke erfolgte mit einem Luxmeter.

Zur Ermittlung der Beziehung zwischen Vergrösserung der bestrahlten Oberfläche und PAL-Aktivität musste das Gewebe vor der Bestrahlung auf Agar verstrichen werden. Hierzu wurden Petrischalen mit einem inneren Durchmesser von 7 cm verwandt, die etwa 4 mm hoch mit Nährmedium (0,75 % Agar) gefüllt waren. Unter sterilen Bedingungen wurde das Gewebe aus den Kulturröhrchen entnommen, auf die Platten gebracht und dort mit einem L-förmig gebogenen

Glasstab vorsichtig ca. 2 mm hoch verstrichen. Wo es erforderlich war, wurde das Gewebe direkt in den Kulturröhrchen auf der Agaroberfläche verstrichen, oder die Bestrahlungsversuche erfolgten an nicht verstrichenem Haplopappus-Gewebe, das dabei ebenfalls in den Kulturröhrchen verblieb.

3. Bestimmungen

a.) Anthocyanbestimmung

In einem salzsauren Extrakt (1 % HCl) aus anthocyanhaltigem Gewebe wurde nach der Methode von ROBINSON und ROBINSON (1931) das Anthocyan identifiziert. Durchgeführte Farbumschlagversuche, Überprüfung der Verteilung des Pigments zwischen wässriger und organischer Phase, sowie Nachweisreaktionen mit Natriumazetat und Eisen(III)chlorid deuten auf Cyanidin (3, 3', 4', 5, 7-Pentahydroxy-Flavon) (s. a. ARDENNE, 1965).

L e u k o a n t h o c y a n (AMRHEIN und ZENK, 1969) konnte nach der Methode von GOVINDARAJAN und MATHEW (1965) nicht nachgewiesen werden.

Zur Bestimmung des A n t h o c y a n g e h a l t s wurde das bestrahlte Gewebe mit einem HCl-Propanolgemisch (HCl 1,0 , Propanol 25,0 , Wasser 74,0; MOHR, 1957) im Glashomogenisator homogenisiert. In den Extrakten konnte nach dem Zentrifugieren der Anthocyangehalt durch Messen der Extinktion bei 546 nm im Eppendorf-Photometer direkt bestimmt werden. Im Gegensatz zu anderen Autoren (z.B. LACKMANN, 1968) konnte als Bezugsgrösse nicht die bestrahlte Oberfläche gewählt werden. Die vorliegenden Messwerte mussten daher auf g Frischgewicht bezogen werden.

In Verdünnungsreihen ergab sich eine lineare Abhängigkeit der Extinktion von der Anthocyankonzentration. Da somit das Lambert-Beer'sche Gesetz für diese Bestimmungsmethode gültig ist (EBERHARDT, 1954), konnten die Extinktionswerte als Mass für den Farbstoffgehalt des Gewebes verwendet werden und eine Eichkurve sowie eine genauere quantitative Analyse des Anthocyans erübrigten sich.

Die quantitative Bestimmung der Hydroxyzimtsäuren erfolgte im Zeiss-Spektralphotometer PMQ II bei 330 nm (Extinktionsmaximum der Kaffeesäure). Dazu musste 1 g Gewebe mit 5 ml 80 % Äthanol 10 Minuten im Wasserbad gekocht, nach dem Abkühlen zentrifugiert und mit 80 % Äthanol auf 5 ml aufgefüllt werden. Zur Bestimmung wurde 0,1 ml alkoholischer Extrakt mit 2,9 ml 80 % Alkohol verdünnt und gegen 80 % Alkohol gemessen.

b. PAL Bestimmung

Vor der Homogenisation des Gewebes zur Bestimmung der PAL-Aktivität wurde das für die Bestimmung von Enzymaktivitäten vorgesehene Gewebe auf Filtrierpapier vorsichtig abgetrocknet, gewogen und je 1 g Frischgewicht mit 1,5 ml Boratpuffer (0,2 M; pH 8,8) und ca. 1 g Seesand im zuvor eisgekühlten Mörser homogenisiert.

In allen vorliegenden Versuchen wurde die PAL-Aktivität ander nach Inkubation mit Phenylalanin gebildeten Zimtsäure gemessen. Für die Bestimmung mussten jedoch unterschiedliche Methoden angewandt werden, was hauptsächlich darauf zurückzuführen ist, dass die Homogenisate von Haplopappusgewebe - je nach vorheriger Behandlung des Gewebes - durch Phenole oder aber durch enthaltenes Anthocyan mehr oder weniger stark dunkel gefärbt waren.

In den Fällen, in denen es die Färbung des Homogenisats zuliess, wurde die Aktivität der Phenylalanin-Desaminase durch **direkte Messung** der entstehenden Zimtsäure bei 290 nm während der Inkubation mit Phenylalanin bei pH 8,8 und 40° C bestimmt. Hierfür stand ein registrierendes Spektral-Photometer Beckmann DK 2A mit temperierbarem Küvettenhalter (Temperaturgenauigkeit bei 40° C ± 0,3°) zur Verfügung.

Bei Inkubation von 0,1 ml Homogenisat mit 10 µMol Phenylalanin/ml 0,2 M Boratpuffer (pH 8,8) bei 40° C und Messung bei 290 nm wurden die gefundenen Werte in mU PAL/mg Protein ausgedrückt. Eine Einheit (U) PAL wird definiert als die Enzymmenge, die die Synthese von 1 µMol trans-Zimtsäure/min unter den Standardversuchsbedingungen katalysiert.

Nach der Inkubation konnte aus der Reaktionsmischung das **Reaktionsprodukt** mit Äther extrahiert werden. Die hierbei gewonnene Substanz wurde spektrophotometrisch in Scanning-Verfahren mit synthetischer trans-Zimtsäure verglichen. Die Extinktionskurven stimmten überein (Abb. 4). Bei stark gefärbten Gewebehomogenisaten wurde daher, da die direkte Messung nicht möglich war, die während der Inkubation gebildete Zimtsäure mit Äther ausgeschüttelt (Tabelle Analysenschema S.23).

c.) MDH-Bestimmung

Die Bestimmung der **Malat-Dehydrogenase** Aktivität beruht auf der Umsetzung von Oxalazetat zu L-Malat, die von MDH katalysiert wird. Das dabei entstehende NAD^+ wird bei 365 nm photometrisch bestimmt.

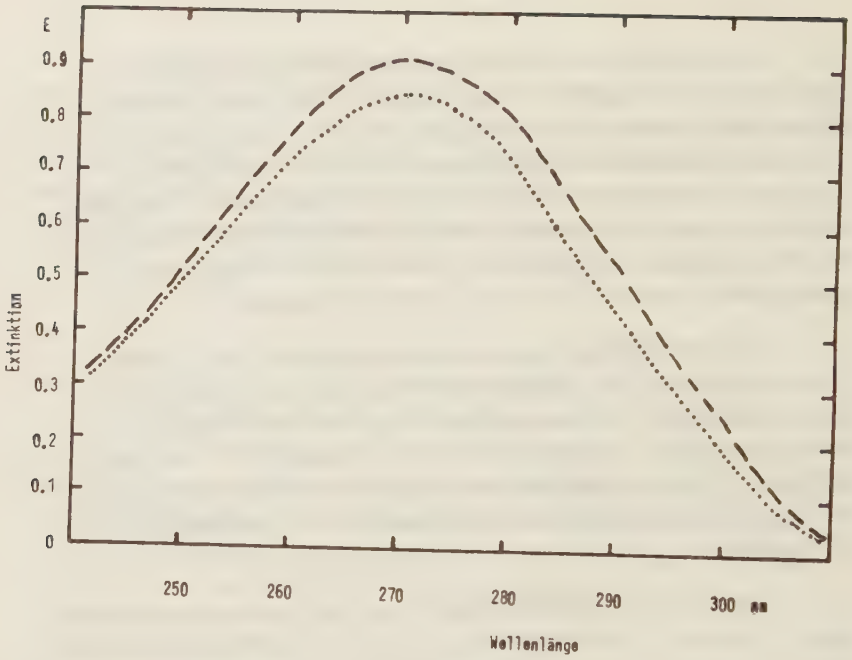


Abb. 4 : Extinktionskurven von synthetischer Zimtsäure und dem nach Inkubation mit L - Phenylalanin aus dem Homogenisat ausgeschüttelten Reaktionsprodukt .

---------- Reaktionsprodukt

..... synthetische Zimtsäure

In eine 1 cm Glasküvette wurden nacheinander 2,85 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,5; 0,03 ml 15 mM $NADH_2$ und 0,02 ml Gewebehomogenisat gegeben und dann die Reaktion durch Zugabe von 0,1 ml 20 mM Oxalazetat gestartet. Die Messung erfolgte bei 25° C im Zeiss-Filterphotometer PL4 bei 365 nm gegen Luft. Die erhaltenen Extinktionsdifferenzen pro Minute wurden mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten in spezifische Aktivität (U/ml Homogenisat) umgerechnet (Reagenzien und Testvorschrift der Fa. BOEHRINGER & SÖHNE, 1969).

d.) Proteinbestimmung

Die für die P r o t e i n b e s t i m m u n g vorgesehenen Proben von je 0,5 ml Homogenisat blieben, mit 0,5 ml 20 %iger Trichloressigsäure (TCA) versetzt, über Nacht bei 4° C stehen. Nach Zentrifugieren, Dekantieren des Überstandes und Waschen mit 1 ml 10 %iger TCA wurde der Rückstand nach der Mikro-Kjeldahlmethode aufgeschlossen und der Stickstoffgehalt nach Zusatz von Nessler's Reagenz photometrisch bestimmt. (CLEGHORN und JENDRASSIK, 1934). Aus der in einem Filterphotometer in 2 cm Küvetten bei 436 nm bestimmten Extinktion konntendie entsprechenden Stickstoffwerte anhand einer $(NH_4)_2SO_4$-Eichkurve errechnet werden. Mit dem empirischen Faktor 6,25 multipliziert (HINSBERG und LANG, 1951) ergab sich der Proteingehalt des Homogenisats.

e. Disc-Elektrophorese

Die D i s c - E l e k t r o p h o r e s e zur Trennung von löslichen Proteinen erfolgte mit Hilfe von Puffertrögen, die aus handelsüblichen Gefrierschalen hergestellt waren und einem Netzgerät, das über eine Schaltuhr mit zwei Platin-Iridium Elektroden verbunden war und das System in bestimmten Intervallen mit Strom versorgte (Abb. 5). Die Gele für die 10,5 cm langen Röhrchen wurden nach ORNSTEIN und DAVIS (1964) hergestellt. Zur Verwendung kamen Gele mit 3,5 %, 5,25 % und 7 % Polyacrylamid (Tab. 3).

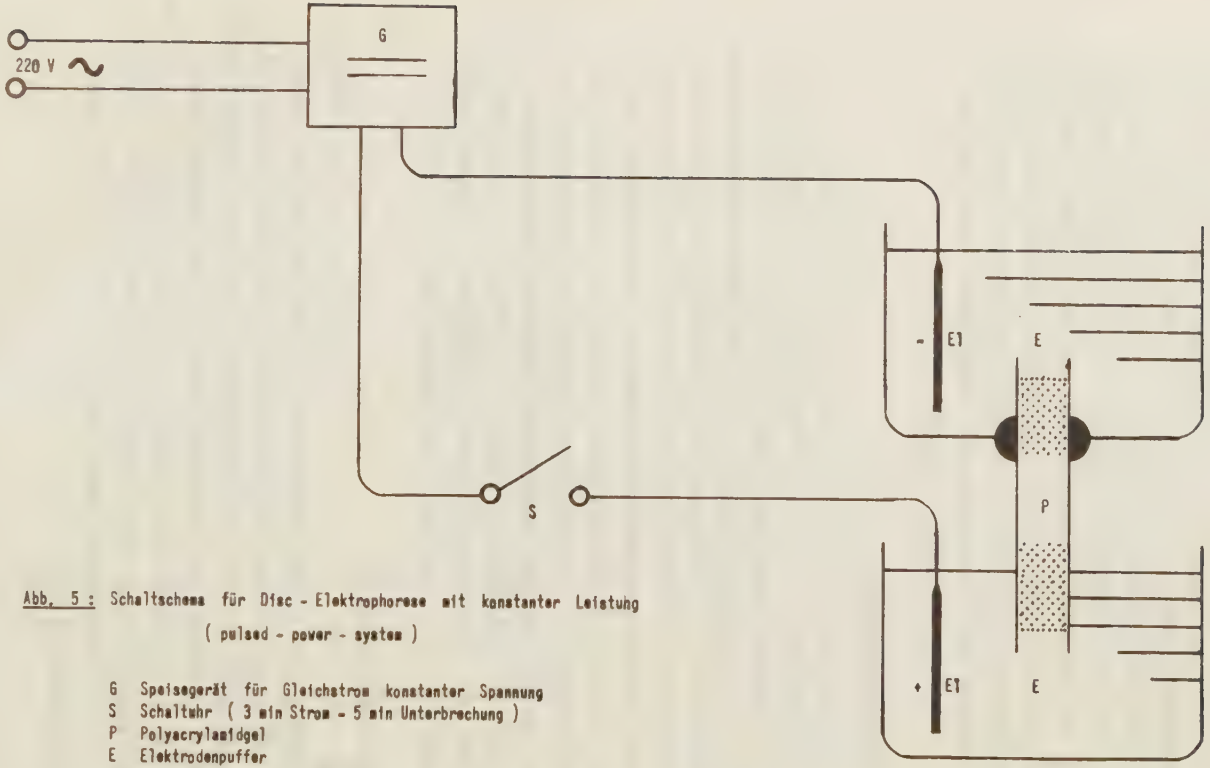


Abb. 5 : Schaltschema für Disc - Elektrophorese mit konstanter Leistung
(pulsed - power - system)

G Speisegerät für Gleichstrom konstanter Spannung
S Schaltuhr (3 min Strom - 5 min Unterbrechung)
P Polyacrylamidgel
E Elektrodenpuffer
El Platin - Iridium - Elektrode

Tabelle 3:

Gelsystem nach ORNSTEIN und DAVIS (1964) pH 8,9 für 7 %ige Polyacrylamidgele (Bei 3,5 und 5,25 % Gelen entsprechend weniger Lösung 2 nehmen, dafür mehr Wasser).

Lösung Nr.	Bestandteile/100 ml dest. Wasser	
1 (pH 8,9)	1 n HCl	48,0 ml
	TRIS	36,3 g
	TEMED	0,23 ml
2	Acrylamid	28 g
	BIS	0,73 g
3	Persulfat	0,14 g
4 (pH 6,7)	1 n HCl	48 ml
	TRIS	5,98 g
	TEMED	0,46 g
5	Acrylamid	10 g
	BIS	2,5 g
6	Riboflavin	4 mg
7	Saccharose	40 g

Elektrodenpuffer: (pH 8,3) Vor Gebrauch 1:5 verdünnen

TRIS	6,0 g
Glycin	28,8 g
dest. Wasser ad	1000,0

Sammelgel	Trenngel
1 Teil Lösung 4	1 Teil Lösung 1
2 Teile Lösung 5	2 Teile Lösung 2
1 TeilLösung 6	1 Teil Wasser
4 Teile Lösung 7	4 Teile Lösung 3

Für jedes Röhrchen wurden ca. 50 µg Protein aufgetragen, entsprechend jeweils 0,2 g aktiven Gewebes. Während des Laufes (max. 2 Std.) wurde der Elektrodenpuffer mittels eines Magnetrührers ständig umgerührt, um eventuelle pH-Verschiebungen und einen diskontinuierlichen Lauf wegen der seitlichen Anbringung der Elektroden zu verhindern und gleichmässigen Ionendurchgang zu gewährleisten. Während der Trennung kommt es zu lokaler Erwärmung (JOULE'sche Wärme) und damit zu Hitzeinaktivierung von hitzeempfindlichen Enzymen. Kühlung von aussen kann diese Wärme, da sie direkt am Medium auftritt, nicht ausreichend ableiten. Daher ist es vorteilhafter, durch rhythmische Stromunterbrechungen stromlose Phasen zu schaffen, in denen die Wärme nach aussen abfliessen kann. Durch Verwendung einer Schaltung, die nach dreiminütigem Stromfluss für 5 Minuten den Stromfluss unterbrach, konnte so eine relativ schnelle und schonende Trennung erreicht werden. Nach dem Lauf wurden die Gele in Scheiben zerschnitten und mit 0,06 ml Phenylalaninlösung 0,1 M und 0,94 ml Boratpuffer 11 Stunden bei 40° C inkubiert. Danach wurde die synthetisierte Zimtsäure durch Messen der Extinktion bei 280 nm bestimmt (0,6 ml Gel-Eluat + 1,5 ml Boratpuffer).

f.) Fehlerrechnung

Die s t a t i s t i s c h e n Berechnungen zur Überprüfung der Signifikanz wurden in allen Fällen, in denen die Aussage eines Versuches quantitative Unterschiede erbrachte, mit dem t-Test nach STUDENT (PÄTAU, 1943) durchgeführt. Als signifikant wurde bezeichnet, was bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit unterhalb $p=0,01$ für t einen höheren Wert ergab, als unter der entsprechenden Zahl der Freiheitsgrade angegeben.

g,) Chemische Substanzen

Die verwendeten chemischen Substanzen, Lösungen und Lösungsmittel stammten, wenn an entsprechender Stelle nicht anders vermerkt, von der Fa. Merck (Darmstadt). Für die Nährmedien und die Photometrie kamen nur analysenreine Substanzen zur Verwendung. Bei der Chromatographie wurden besonders reine Laufmittel verwendet.

Alle anderen Substanzen hatten den Reinheitsgrad "reinst" oder Arzneibuchqualität (DAB 7).

C. ERGEBNISSE

I. Versuche zur PAL-Bestimmung

Vor der Durchführung der eigentlichen PAL-Bestimmungen mussten die methodischen Schritte anhand verschiedener Vorversuche überprüft werden, um möglichst optimale Versuchsbedingungen zu erreichen.

1. Ermittlung der optimalen Homogenisationsdauer

Durch Bestimmung des löslichen Proteinstickstoffs (siehe unten) im Homogenisat konnte die notwendige Homogenisationszeit festgestellt werden. Bezeichnet man die nach 15minütiger Homogenisation extrahierte Menge Protein als 100 %, so waren nach 5 Minuten 79 %, nach 7 Minuten 93 % und nach 10 Minuten 96 % extrahiert. Demzufolge erschien als ausreichend, 10 Minuten zu homogenisieren (Abb. 6).

Mercaptoäthanol (MA) (30 mMol/l Boratpuffer) diente als SH-Stabilisator der PAL. Allgemein wird das Bedürfnis für SH-Reagenzien bei der Extraktion von PAL betont (ENGELSMA, 1967; ATTRIDGE und SMITH, 1967). Neben dem als Zusatz zum Extraktions-Puffer vielfach verwendeten Mercaptoäthanol wurde auch Cystein (100 mg/l) verwendet: Es zeigte sich kein Vorteil gegenüber MA.

Die verschiedentlich empfohlene Anwendung von Aktivkohle (10 mg/ml Homogenisat) verringerte zwar die Braunfärbung des Homogenisats durch Phenole (DURST, 1969), absorbierte aber auch Protein. Die PAL-Aktivität war nach Kohlebehandlung um fast 20 % niedriger als in Homogenisaten ohne Kohlezusatz :(Tab. 4) Aus demselben Grunde unterblieb auch die Verwendung von Polyvinylpyrrolidon (ANDERSON, 1967).

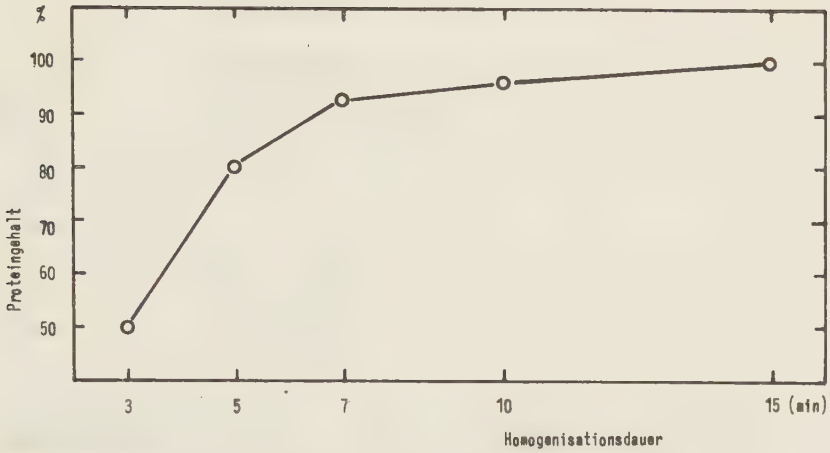


Abb. 6 : Ermittlung der optimalen Homogenisationsdauer.

Abhängigkeit des Proteingehalts im Homogenisat von der Dauer der Homogenisation.
(Proteingehalt nach 15 min : 100 %)

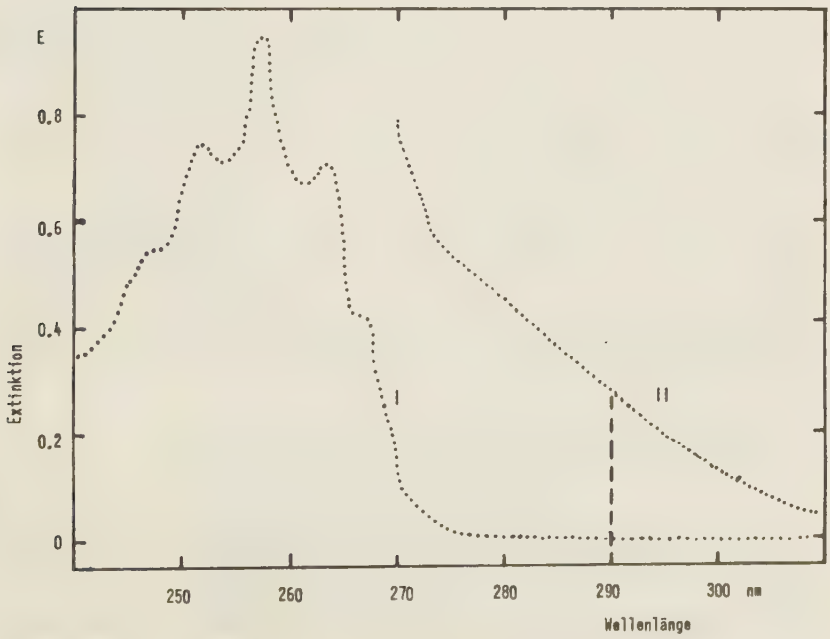


Abb. 7 : Inkubation mit L-Phenylalanin ; Verfolgung der Zimtsäuresynthese.

Extinktionsspektrum eines Homogenisats nach Versetzen mit Phenylalaninlösung (I)
Dasselbe Homogenisat nach mehrstündiger Inkubation bei 40°C (II).
Bestimmung der Zimtsäure bei 290 nm wird durch Phenylalanin nicht gestört.

Tabelle 4: PAL-Aktivität im Homogenisat nach Kohlebehandlung	
Homogenisat ohne Kohlebehandlung:	11 mU PAL/ml 11,5 mU PAL/ml
nach Kohlebehandlung:	9 mU PAL/ml 9,4 mU PAL/ml

2. Dünnschichtchromatographische Bestimmung der PAL-Aktivität

Bei zu stark gefärbten Gewebehomogenisaten musste die während der Inkubation synthetisierte Zimtsäure aus der Lösung mit Äther ausgeschüttelt werden (s. Schema S. 23).

Zur E x t r a k t i o n der Zimtsäure wurde die salzsaure Lösung (pH 1) im Scheidetrichter mit Äther ausgeschüttelt, die gesammelten Ätherfraktionen mit Na_2SO_4 sicc. getrocknet, der Äther im Rotationsverdampfer auf ca. 1 ml eingeengt und diese Lösung zur chromatographischen Abtrennung der Zimtsäure mit dem DESAGA-Autoliner (Modell 1969) auf DC-Fertigplatten F 254 (Merck) aufgetragen. Die Platten wurden in Benzol/Eisessig 90:10 entwickelt, die Flecken unter der UV-Lampe identifiziert (Zimtsäure Rf = 0,42), mit dem Spatel abgekratzt und die Zimtsäure daraus durch dreimaliges Eluieren mit je 2 ml Alkohol gelöst und in ein graduiertes Reagenzglas gespült (10 ml). Die quantitative Bestimmung erfolgte photometrisch in 1 cm Quarzküvetten am Zeiss PMQ II bei 270 nm mit Hilfe einer Eichkurve.

3. Photometrische Bestimmung der PAL-Aktivität

Phenylalanin (257.nm) und Zimtsäure (270.nm) haben dicht beieinanderliegende E x t i n k t i o n s m a x i m a . Bei der spektrophotometrischen Messung zwischen 275 und 295 nm lässt sich jedoch die Zimtsäuresynthese ungestört verfolgen. (Abb. 7). Als günstigste Wellenlänge ergab sich 290 nm.

ANALYSENSCHEMA FÜR DC[x]-TRENNUNG DER ZIMTSÄURE

(Schüttelgang und Chromatographie)

Gewebehomogenisat zentrifugieren, mit 0,1 M Phenylalaninlösung bei 40°C inkubieren, Reaktion stoppen mit 12,5 n HCl (pH = 1).

↓

Saure Lösung filtrieren, 3 x mit Äther extrahieren, Ätherphasen vereinigen.

↙ ↘

Wasserphase (enthält anorganische Bestandteile) verwerfen.

Ätherphase 3 x mit gesätt. Bicarbonatlösung ausschütteln, wässrige Extraktionen vereinigen.

↓

Bicarbonatauszug mit verd. Schwefelsäure ansäuern, mit Äther 3 x extrahieren, Extraktionen vereinigen.

↓ ↘

Wasserphase(enthält starke Säuren) verwerfen.

Ätherphase(enthält starke und schwache Phenole, schwache Säuren, Neutralkörper) trocknen und einengen, in Alkohol aufnehmen.

↓

alkoholische Lösung auf DC-Platten F 254 auftragen, Benzol-Eisessig 90:10, 35 min laufen lassen.

↓

Flecken unter UV markieren (Rf 0,42), 3 x mit Alkohol eluieren, Zimtsäure photometrisch bestimmen.

---

[x] DC = Dünnschicht-Chromatographie

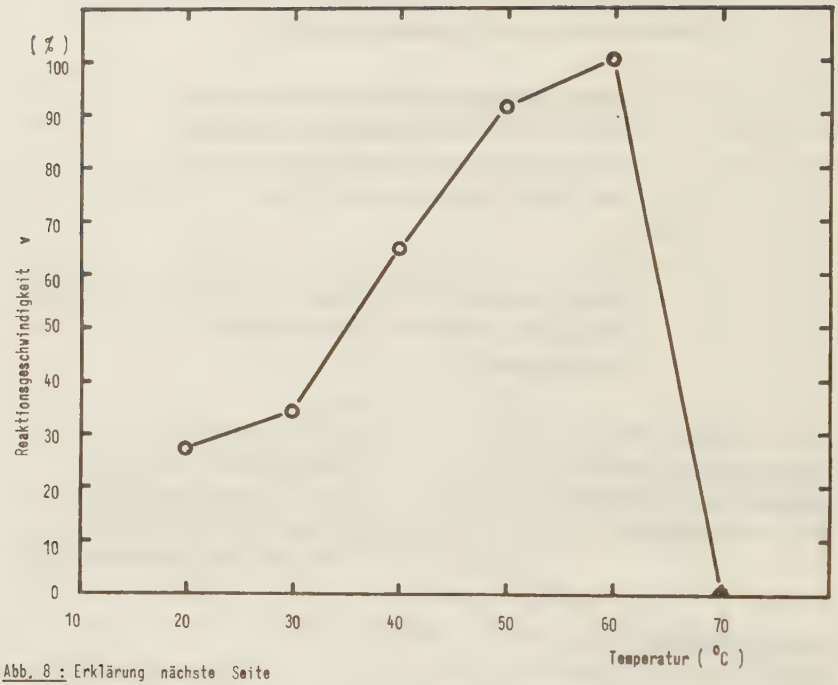


Abb. 8 : Erklärung nächste Seite

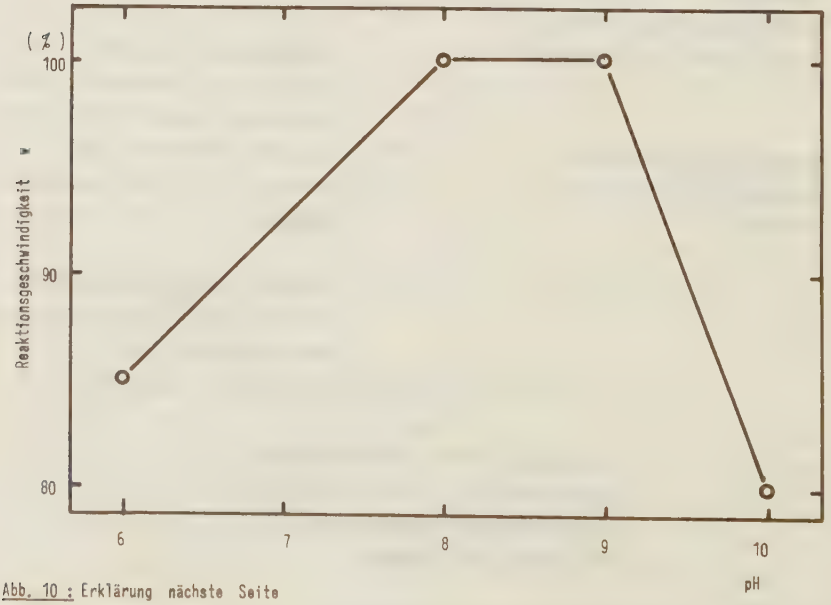


Abb. 10 : Erklärung nächste Seite

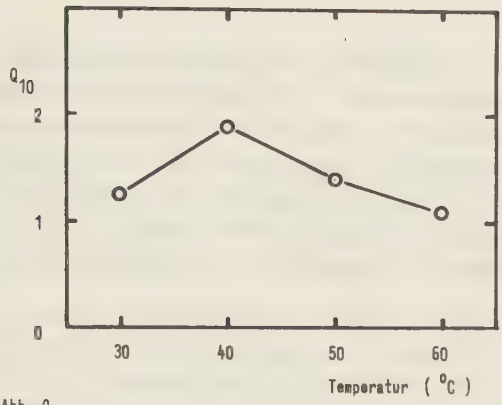


Abb. 9.

Abb. 8 : Reaktionsgeschwindigkeit bei verschiedenen Temperaturen.
Ordinate : v (%) ΔE/h bei 290 nm ; 0,35 = 100 % .
ΔE gemessen während der Inkubation mit L-Phenylalanin bei pH 8,8 (Boratpuffer) .

Abb. 9 : Q_{10} der enzymatischen Umsetzung von L-Phenylalanin zu trans-Zimtsäure bei verschiedenen Temperaturen (30 - 60°C), gemessen während der Inkubation mit L-Phenylalanin bei pH 8,8 (Boratpuffer) .

Abb. 10 : Reaktionsgeschwindigkeit bei verschiedenen pH .
Ordinate : v (%) E/h bei 290 nm; 0,35 = 100 %.
ΔE gemessen bei Inkubation mit Phenylalanin bei 40°C.

In Bezug auf die Menge des eingesetzten Homogenisats waren zwei begrenzende Faktoren zu berücksichtigen. Einerseits verbot die Färbung des Homogenisats, mehr als 0,15 ml Homogenisat/ml zu inkubieren, andrerseits waren mindestens 0,05 ml erforderlich, um die Genauigkeit der Messung zu gewährleisten. Innerhalb dieser Grenzen waren die erzielten Ergebnisse proportional der eingesetzten Menge Homogenisat.

Bei den verschiedenen Autoren weichen die Angaben für die I n k u b a t i o n s t e m p e r a t u r stark voneinander ab. Z.B. geben BELLINI und VAN POUCKE (1970) 25°C, HAVIR und HANSON (1968a) 30° nd KOUKOL und CONN (1961) 40° C an. Anhand von Versuchen bei Temperaturen zwischen 20 und 70° C wurde als optimale Inkubationstemperatur 40° C ermittelt (siehe Abb. 8; 9), da hier der Q_{10} mit 1,9 am höchsten war (Abb. 9).

Die R e a k t i o n s g e s c h w i n d i g k e i t bei der Inkubation von PAL mit Phenylalanin lag am höchsten bei pH 8 - 8,8 (Abb. 10). Für pH 6 wurde Phosphatpuffer 0,1 M, für pH 8 - 10 Boratpuffer verwendet. Für die vorliegenden Bestimmungen wurde Boratpuffer 0,2 M pH 8,8 benutzt.

Der Vergleich der beiden Methoden zur Bestimmung der PAL-Aktivität durch Messung des Reaktionsprodukts ergab, dass nach Ausschütteln, Chromatographie und Elution noch ca. 72 % vorgegebener synthetischer Zimtsäure wiedergefunden wurden, während bei der direkten optischen Bestimmung naturgemäss 100 % der sich bildenden Zimtsäure gemessen wurden (Tabelle 5).

Tabelle 5: Bestimmung von Zimtsäure durch Ausschütteln

Vorgegeben µg synthet. Zimtsäure	Wiedergefunden µg Zimtsäure	% Ausbeute
25	18	72
50	36	72
75	52	69
100	75	75

4. Wahl der Bezugsgrösse

Als B e z u g s g r ö s s e wurde bei vorangegangenen Arbeiten (z.B. LACKMANN, 1968) über die Anthocyansynthese bei Gewebekulturen von Haplopappus die bestrahlte Oberfläche gewählt, da es sich gezeigt hatte, dass die Anthocyansynthese nur in den obersten Zellschichten abläuft. Versuche, in denen bei konstanter Oberfläche das Gewicht des eingesetzten Gewebes variierte, bewiesen, dass zwischen dem Gewicht und der gebildeten Anthocyanmenge eine geringere Korrelation bestand. Zum Erzielen einer gleichmässigen Oberfläche wurde deshalb das Gewebe auf festem Nährboden in Glasringen verstrichen (LACKMANN). Da sich aber zum einen die PAL im gesamten Gewebe befindet und zum anderen allein das Verstreichen des Gewebes auf dem Nährboden zu einem Anstieg der Enzymaktivität führt, mussten für die vorliegenden Versuche andere Bezugsgrössen gesucht werden.

SCHERF und ZENK (1967 a) wählten Hexokinase als Bezugsgrösse, da sie feststellten, dass sie während ihrer Versuche stets die gleiche Aktivität behielt. In gewisser Übereinstimmung damit zeigten die vorliegenden Ergebnisse bei der Aktivitätsbestimmung der MDH, daß diese, ebenfalls ein an zentraler Stelle im Stoffwechsel befindliches Enzym,

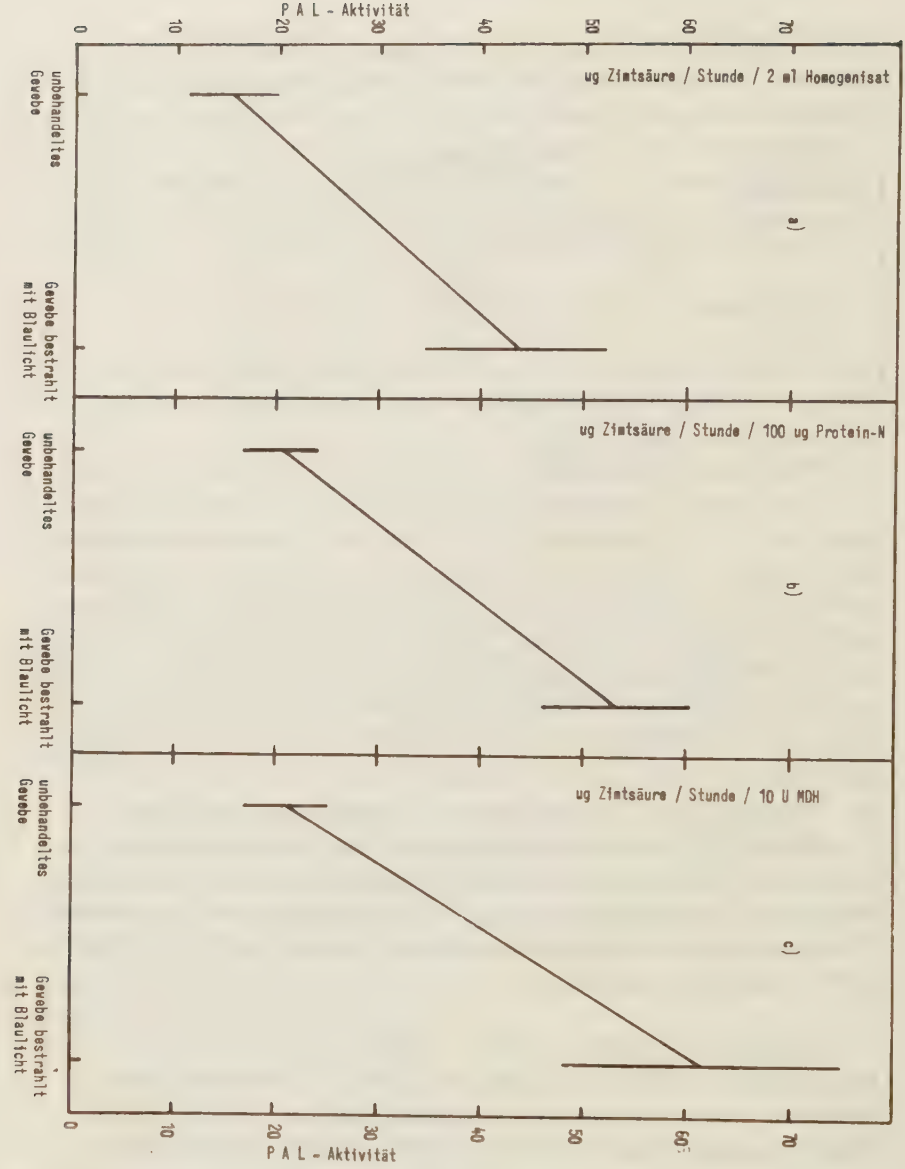


Abb. 11 : Bezugsgrössen für PAL - Aktivität.
PAL-Aktivität gemessen in unbehandeltem Gewebe und nach Blaulichtbestrahlung
PAL-Aktivität bezogen auf a) 2ml Homogenisat
b) 100 ug lösl. Protein-N
c) 10 U MDH

ermittelter 3-facher mittlerer Fehler : a) 19 - 25 %
b) 13 - 17 %
c) 18 - 20 %

während aller Versuche eine so gleichbleibende, hohe Aktivität behielt, dass es sich anbot, sie evtl. als Bezugsgrösse einzusetzen.

Anhand der Berechnung des dreifachen mittleren Fehlers ($\pm$ 3m) wurden Bezugsgrössen gesucht. Es ergaben sich folgende Aussagen: (siehe Abb. 11 und Tabelle 6).

Tabelle 6 : 3-facher mittlerer Fehler (3m) bei Verwendung verschiedener Bezugsgrössen

Aktivität (PAL)	bezogen auf	3m (Mittelwerte)
µg Zimtsäure/h	2 ml Homogenisat	22,2 %
µg Zimtsäure/h	10 U MDH	18,5 %
µg Zimtsäure/h	100 µg lösliches Protein	15,6 %

Bei Beziehung der gefundenen PAL-Werte auf Protein war der 3fache mittlere Fehler am geringsten, Demzufolge wurde bei den vorliegenden Versuchen die PAL-Aktivität in der Hauptsache auf das im Gewebehomogenisat bestimmte lösliche Protein bezogen. Mit Rücksicht auf die Genauigkeit der Ergebnisse für die PAL-Aktivität konnten die entsprechenden Anthocyanwerte nicht auf die Oberfläche bezogen werden. Es war jedoch möglich, trotz grösserer Streuung, die auftretenden quantitativen Unterschiede statistisch abzusichern.

5. Reaktionsfähigkeit des Gewebes bei verschiedenen Temperaturen

In vorhergehenden Versuchen waren die Homogenisate oft durch Phenole stark gefärbt. Das konnte durch Senken der Temperatur von 28° auf 23° C stark reduziert werden, ohne dass die Reaktionsfähigkeit hinsichtlich der Induktion der PAL

beeinträchtigt war (Abb. 12). Nach Bestrahlung des Gewebes wurde sowohl bei 23°, als auch bei 28° C nach 48 Stunden ein Maximum der PAL-Aktivität erreicht. Auf die PAL-Aktivität war also der Einfluss der Temperatur, jedenfalls in diesem Bereich, nicht bedeutend. Aus diesem Grunde konnten die folgenden Versuche bei 23° C durchgeführt werden.

Abb. 12 : Einfluss der Temperatur auf die PAL-Aktivität bei Induktion durch Blaulichtbestrahlung.

———— bei 28° C
---------- bei 23° C

II. PAL-Aktivität und Anthocyansynthese in Gewebekulturen von Haplopappus gracilis

Bei der Untersuchung der Faktoren, die zur Erhöhung der PAL-Aktivität im Gewebe führen, wurden die in den vorangegangenen Versuchen ermittelten optimalen Bedingungen verwandt.

1. PAL-Aktivität in unbestrahltem verstrichenem Gewebe in Abhängigkeit von der Kulturdauer

In unbestrahltem Haplopappusgewebe ist die PAL-Aktivität verschiedenen Schwankungen unterworfen. Wie die Beobachtungen zeigen, nimmt die in dem Gewebe gemessene PAL-Aktivität nach dem Übertragen durch Verstreichen auf frischem Nährmedium innerhalb einer Kulturdauer von 28 Tagen bei einer Temperatur von 23° C von fast 50 mU/mg löslichem Protein am ersten Tag nach dem Übertragen auf etwa 5 mU/mg löslichem Protein ab. In Homogenisaten von Gewebe, das beim Übertragen auf dem Agar verstrichen worden war, wurde nach 24 Stunden und danach wöchentlich die PAL-Aktivität bestimmt. Zu den jeweils durchgeführten 4 - 5 Bestimmungen dienten die in unbehandeltem Gewebe bestimmten Aktivitäten als Kontrollwerte.

Nach der ersten Woche war bereits eine starke Abnahme der PAL-Aktivität gegenüber dem ersten Tag zu beobachten. Diese Abnahme (60 %) ging in der ersten Woche sehr schnell vor sich und in der 2., 3. und 4. Woche dann langsam ins Geradlinige über (Abb. 13). Während dieser ganzen Zeit blieb der Proteingehalt annähernd gleich (Tabelle 7, Abb.13).

Tabelle 7: MDH-Aktivität und Gehalt an löslichem Protein in Gewebehomogenisaten nach Übertragen:

Zeit nach Übertragen	MDH U/mg Protein	µg Protein/ml Homogenis.
1 Woche	9,3	252
2 Wochen	9,9	262
3 Wochen	10,3	277
4 Wochen	10,0	253

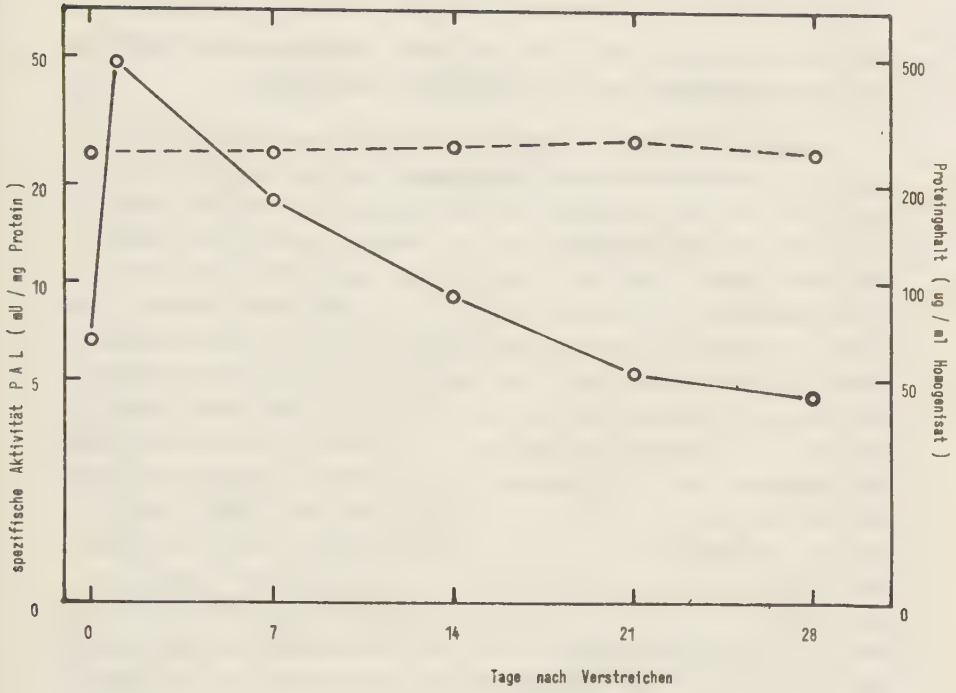


Abb. 13 : Proteingehalt und P A L - Aktivität während einer Kulturperiode.
Induktion zu Beginn der Kulturperiode durch Verstreichen auf frischem Nährmedium.
Ordinate (logarithmisch geteilt) : a) spezifische Aktivität (P A L) .
b) ug Protein / ml Homogenisat .

———————— P A L - Aktivität
- - - - - - - - - Proteingehalt

Auch die MDH-Aktivität blieb mit etwa 10 U/mg Protein während der Übertragungsperiode unverändert (Tabelle 7).

Nach der Kulturperiode von 4 Wochen wurde das Gewebe wieder auf frisches Medium übertragen und die PAL-Aktivität in den ersten Stunden nach dem Übertragen in Homogenisaten des verstrichenen Gewebes und zum Vergleich in nicht übertragenem Gewebe bestimmt. In den Versuchen, die aus je 3 - 5 Bestimmungen bestanden und alle 6 - 12 Stunden durchgeführt wurden, konnte ein Anstieg der PAL-Aktivität in dem Gewebe innerhalb von 24 Stunden (bei gleichbleibender MDH-Aktivität von ca. 10 U/mg Protein) wieder um ca. 700 % auf den Wert um 50 mU beobachtet werden. Die Aktivität hielt sich dann fast konstant bis 72 Stunden, um danach steil abzufallen.und war bereits nach 168 Stunden auf 32 % der Aktivität von 24 Stunden gesunken (Abb. 14). Dieser Effekt wird im Folgenden als " V e r s t r e i c h e f f e k t " bezeichnet, da er durch den Reiz des Verstreichens verursacht wird und den, den das frische Nährmedium nach dem Übertragen auf das Gewebe ausübt. Auch bei den Suspensionen war ein ähnlicher Effekt durch das Medium zu beobachten.

2. PAL-Aktivität und Anthocyangehalt von nicht verstrichenem Gewebe nach Bestrahlung mit Blaulicht

3 Wochen altes (seit Übertragen) Haplopappusgewebe wurde in den Kulturröhrchen bei einer Temperatur von 23° C mit Blaulicht einer Intensität von 12 000 erg/cm^{2}sec bestrahlt. Alle 6 - 12 Stunden wurden Kulturröhrchen mit Gewebe entnommen und darin die PAL-Aktivität bestimmt. Gleichbehandelte Röhrchen, im Dunkeln gehalten, dienten als Kontrollwerte. Jeder errechnete Wert ging aus 3 - 5 einzelnen Bestimmungen hervor. Bereits nach 6 Stunden war ein signifikanter Anstieg der PAL-Aktivität zu beobachten. Beim Maximum nach 48 Stunden lag die Aktivität um 400 % über der des Kontrollwertes.

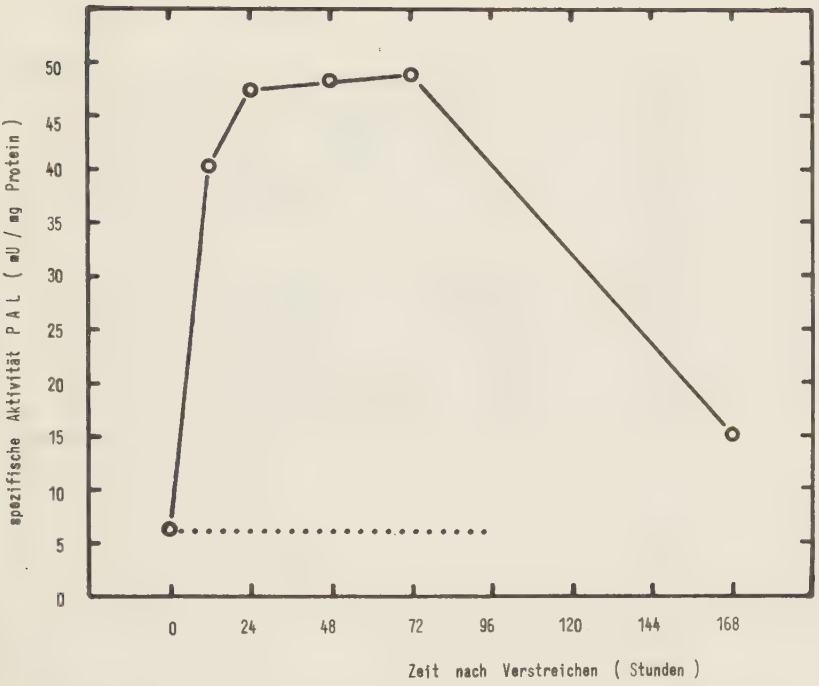


Abb. 14 : P A L - Aktivität in unbestrahltem Gewebe , nach Verstreichen auf frischem Nährmedium .

———————— Aktivität im verstrichenen Gewebe
..... Kontrolle (nicht verstrichen) .

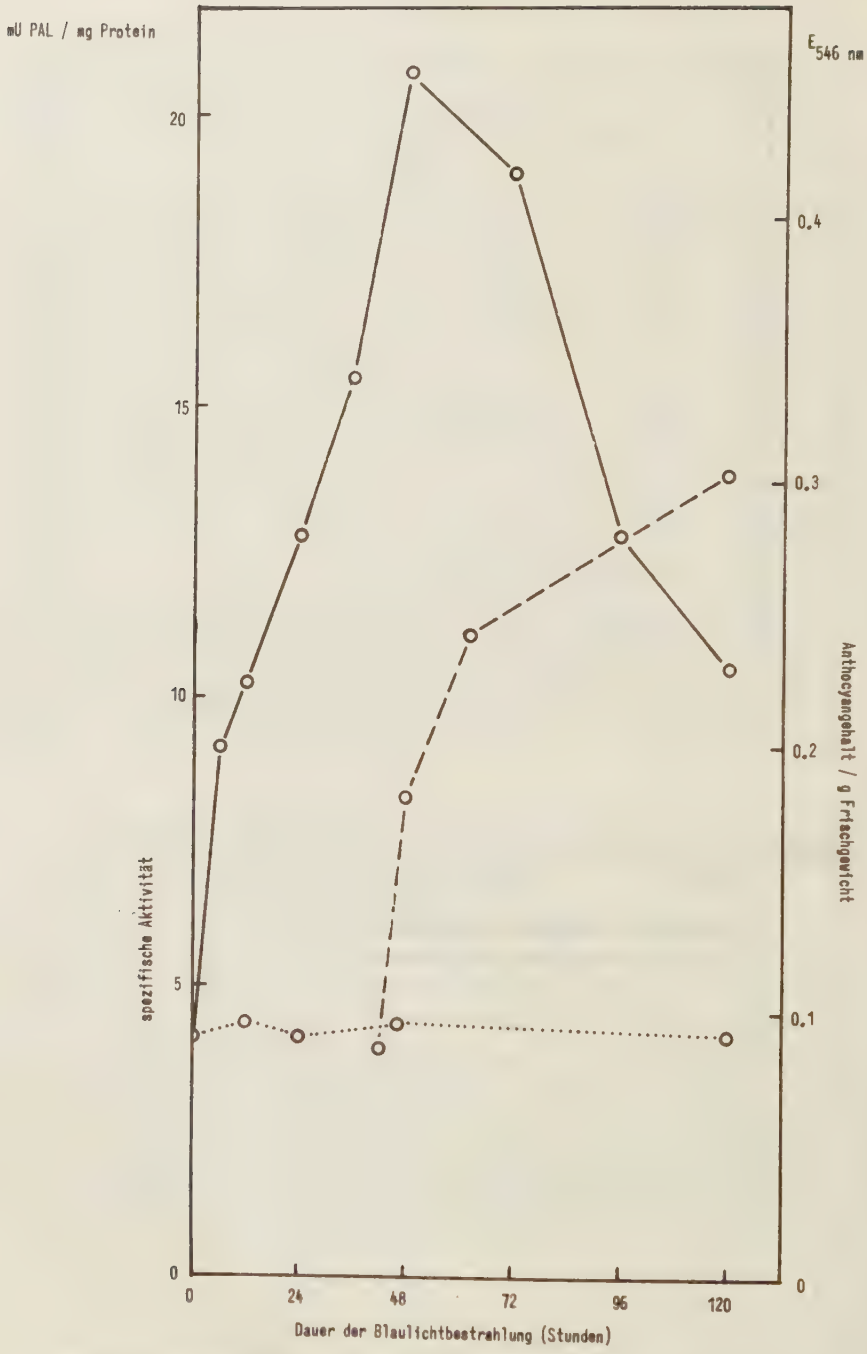


Abb. 15 : Abhängigkeit der PAL-Aktivität und des Anthocyangehalts von der Dauer der Blaulichtbestrahlung (unverstrichenes Gewebe, 3 Wochen alt).

——— spezifische Aktivität des bestrahlten Gewebes

····· spezifische Aktivität der Kontrolle (dunkel)

– · – · – Anthocyangehalt

Danach fiel die PAL-Aktivität wieder ab, um nach 120 Stunden etwa einen Wert zu erreichen, wie er einer 24-stündigen Bestrahlungsdauer entsprach und um 50 % unter dem Maximalwert lag. Die zum Vergleich auch in unbestrahltem Gewebe gemessene PAL-Aktivität blieb während dieser Zeit unverändert (Abb.15)

Der Anthocyangehalt des bestrahlten Gewebes wurde parallel zu der PAL-Aktivität nach 42, 48, 62 und 120 Stunden bestimmt und zeigte während dieser Zeit eine ständige Zunahme. Besonders stark war diese Zunahme zwischen 42 und 62 Stunden (150 %), während nach 120 Stunden schon fast Sättigung erreicht war (Abb. 15).

3. Einfluss von chemischen und mechanischen Reizen sowie Blaulichtbestrahlung auf die PAL-Aktivität und Anthocyansynthese

Haplopappusgewebe wurde unmittelbar nach dem Übertragen auf frisches Medium in ein Blaulichtfeld von 12 000 erg/cm^2sec gebracht und in Abständen von 12 - 24 Stunden in jeweils mindestens 4 - 5 Bestimmungen analysiert.

Die PAL-Aktivität war nach 24 Stunden nicht höher als in der unbestrahlten Vergleichsprobe. Diese Beobachtung zeigt, dass der "Verstreicheffekt" bei Übertragen auf frisches Medium durch Blaulichtbestrahlung nicht gesteigert werden kann, d.h.: eine Addition beider Effekte ist hier nicht erreichbar.

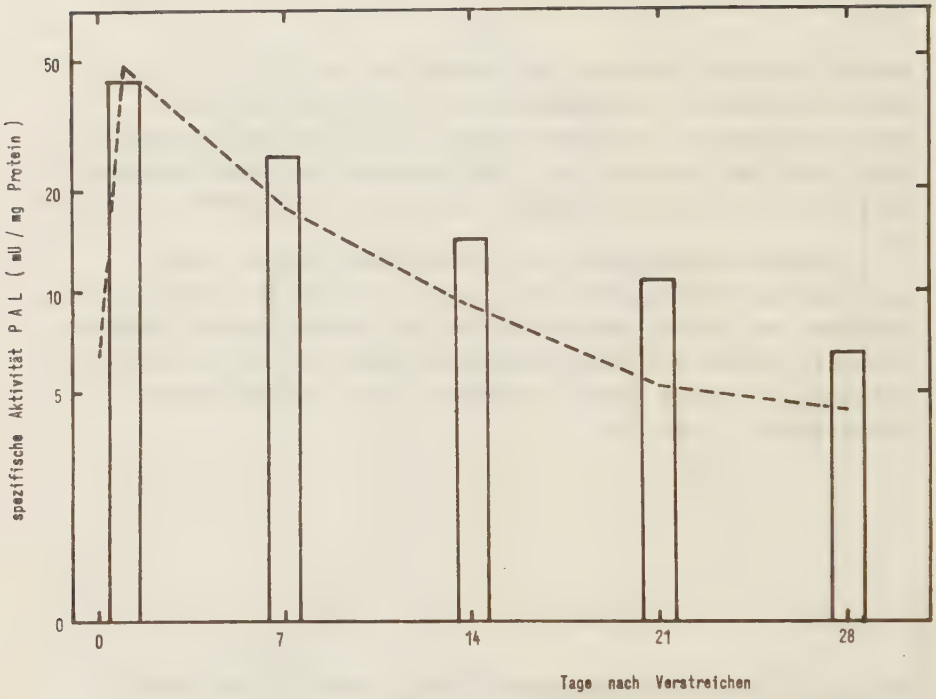


Abb. 16 : Einfluss von 24 Stunden Blaulichtbestrahlung auf Gewebe nach verschiedener Kulturdauer. Induktion zu Beginn der Kulturperiode durch Verstreichen auf frischem Nährmedium.

--------- spezifische Aktivität (PAL) im Dunkeln

□ spezifische Aktivität (PAL) nach 24 Stunden Blaulicht

Eine Woche nach dem Übertragen auf frisches Medium reagierte das Gewebe schwach auf 24stündige Blaulichtbestrahlung, jedoch war die gemessene PAL-Aktivität im bestrahlten Gewebe bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,01$ nicht signifikant höher als im unbestrahlten Gewebe. Auch nach 14 Tagen, als die Aktivitäten im 24 Stunden bestrahlten Gewebe mit unbestrahltem verglichen wurden, war der Unterschied noch nicht signifikant ($p = 0,01$). Erst 3 Wochen nach dem Übertragen war die Reaktion des Gewebes auf die Blaulichtbestrahlung signifikant höher als die Aktivität im unbestrahlten Gewebe (Abb. 16).

4 Wochen nach Übertragen war der Unterschied zwischen bestrahltem und unbestrahltem Gewebe in Bezug auf die PAL-Aktivität nicht mehr signifikant. Hieraus geht hervor, dass der Reiz des Mediums und des Verstreichens mit der Zeit an Wirksamkeit verliert. Auch ist den in Abb. 16 wiedergegebenen Werten zu entnehmen, dass bei Bestrahlungsversuchen grundsätzlich Gewebe verwendet werden muss, das 3 Wochen (seit Übertragen) alt ist, da hier die deutlichsten Reaktionen auf Blaulicht erreicht werden konnten.

4 Wochen altes Gewebe wurde auf dem Nähragar, auf dem es sich seit dem Übertragen befand, auf die gleiche Weise verstrichen, wie üblicherweise beim Übertragen. Im Dunkeln belassen zeigten die entnommenen Proben nach 24 Stunden eine um 85 % höhere PAL-Aktivität gegenüber nicht verstrichenem Gewebe (Abb. 17). Im Gegensatz zu den mit frischem Medium durchgeführten Versuchen konnte hier mit 24 Stunden Blaulicht eine weitere, wesentliche Steigerung der PAL-Aktivität um 245 % gegenüber dem unbestrahlten, unverstrichenen Gewebe erreicht werden.

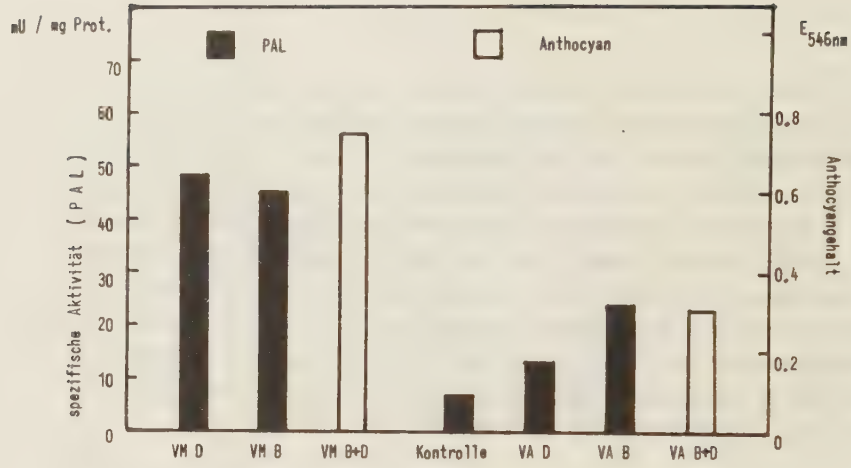


Abb. 17 : Einfluss von Blaulichtbestrahlung und Verstreicheffekt auf die PAL-Aktivität in Gewebe nach verschiedener Kulturdauer. Kontrolle unverstrichen, 4 Wochen alt.

VM verstrichen auf frischem Nährmedium
VA verstrichen auf 4 Wochen altem Nährmedium

B 24 Stunden Blaulichtbestrahlung
D 24 Stunden Dunkel

Ordinate : spezifische Aktivität (PAL)
Extinktion bei 546 nm (Anthocyan)

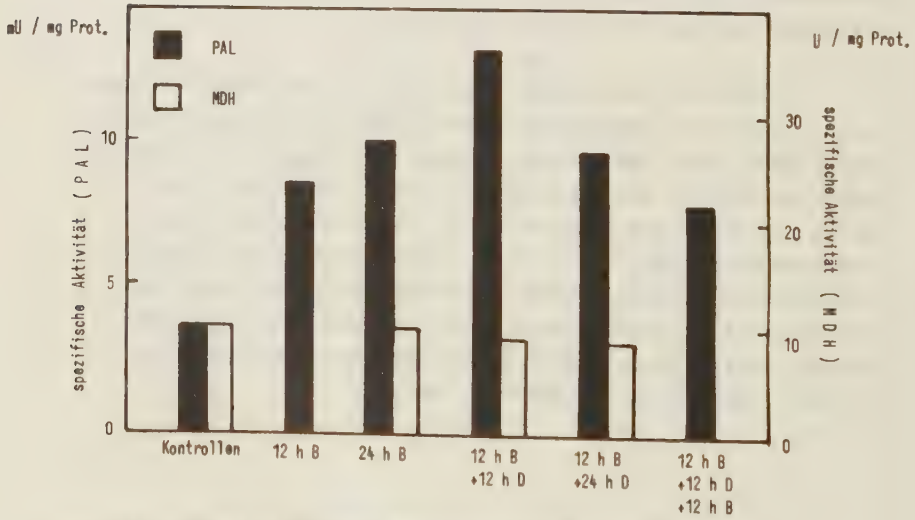


Abb. 18 : Beeinflussung der PAL-Synthese durch weitere Blaulichtbestrahlung nach Induktion durch 12 Stunden Blaulicht im Vergleich zu der MDH-Aktivität. Kontrollen mit entsprechender Dunkelbehandlung. Ordinate : spez. Aktivität PAL und MDH.

B : Blaulicht
D :Dunkel

Beim Vergleich der A n t h o c y a n s y n t h e s e wurde festgestellt, dass die Menge Anthocyan, die nach 24 Stunden Blaulicht und 24 Stunden Dunkel in den auf frischem bzw. auf altem Medium verstrichenen Gewebenfast proportional der nach 24 Stunden Blaulicht gemessenen PAL-Aktivität war (Abb. 17). Die festgestellte PAL-Aktivität war in auf altem Medium verstrichenem Gewebe um 47 % geringer, als bei frischem Medium, während die synthetisierte Menge Anthocyan um 59 % niedriger lag (Abb. 17). Auch in anderen Versuchen und bei der Untersuchung der Suspensionskulturen konnte ein ähnliches Verhältnis festgestellt werden. (siehe S.63)

Aus den obigen Befunden lässt sich erklären, warum die bei LACKMANN (1968) für Anthocyansynthese bei Haplopappus angegebene Bezugsgrösse (bestrahlte Oberfläche frisch verstrichenen Gewebes) und Untersuchungsverfahren bei den vorliegenden Ergebnissen nicht verwendet werden konnten, da dabei zwei Reize (mechanischer Reiz durch Verstreichen, chemischer Reiz durch frisches Medium) auf das Gewebe einwirken, die einzeln oder zusammen weitgehende Veränderungen in der Synthesefähigkeit des Gewebes hervorrufen. Auch der scheinbare Widerspruch zwischen den oben angegebenen Unterschieden der Reaktion verschieden alten Gewebes auf Blaulicht und der bei LACKMANN festgestellten einheitlichen Reaktionen von Gewebe verschiedenen Alters ist dadurch zu erklären, dass bei LACKMANN das 2, 3 und 4 Wochen alte Gewebe vor der Bestrahlung auf frischem Agar verstrichen wurde.- Es musste daher im Einzelnen darauf verzichtet werden, direkte Beziehungen zu den Untersuchungen von LACKMANN (1968) herzustellen.

4. Einfluss von Blaulicht nach Induktion der PAL-Synthese

Wie bereits aus den obigen Angaben ersichtlich, liess sich durch Blaulicht die PAL-Synthese induzieren, nahm jedoch bei weiterer andauernder Blaulichtbestrahlung nach 48 Stunden wieder ab (Abb. 15). Gewebe, das 12 Stunden nach dem Beginn der Bestrahlung entfernt und weitere 12 Stunden dunkel

gehalten worden war, wurde mit Gewebe verglichen, das sich 24 Stunden im Blaulicht befand. Die PAL-Aktivität lag signifikant über der durch 24stündige Blaulichtbestrahlung erreichten PAL-Aktivität, d.h. 12 Stunden nach Beginn der Blaulichtbestrahlung wurde durch weitere Blaulichtgabe nur eine geringere Förderung der PAL-Synthese erreicht, als durch 12 Stunden Dunkel. Wurde das Gewebe nach 12 Stunden Blaulicht 24 Stunden im Dunkeln gehalten, so lag hier die Aktivität signifikant höher als bei Gewebeproben, die nach 12 Stunden Blaulicht und 12 Stunden Dunkel noch einmal 12 Stunden Blaulicht ausgesetzt worden waren. In sämtlichen Versuchen zeigte sich also, dass durch Gabe von Blaulicht über eine 12 Stunden-Periode am Anfang hinaus, durch Blaulicht ein mindernder Einfluss auf die weitere PAL-Synthese ausgeübt wurde. Jeweils 3 Proben wurden bestimmt und die Mittelwerte mit denen der gleichzeitig durchgeführten Parallelversuche in Abb. 18 dargestellt.

In den Homogenisaten der mit Blaulicht verschiedener Dauer bestrahlten Gewebe wurde die MDH-Aktivität bestimmt. Während die PAL-Aktivität, wie die vorangegangenen Versuche zeigen, durchBlaulicht induziert wurde, liess sich die MDH-Aktivität, die im unbestrahlten Gewebe 10 U/mg Protein betrug, durch Blaulicht von verschiedener Dauer weder hemmen noch fördern (Abb. 18).

5. Einfluss von Hell- und Dunkelrotbestrahlung auf die PAL- und MDH-Aktivität und die Anthocyansynthese

Verschiedene Autoren (MOHR und NES, 1963; DOWNS und SIEGELMAN, 1963, u.a.) beschreiben den hemmenden bzw. fördernden Einfluss, den das Phytochromsystem auf die Pigmentsynthese ausübt. Von DURST und MOHR (1966a) wird die Wirkung des Phytochroms auf die PAL-Synthese beschrieben. Während in diesen Fällen ganze Pflanzen, bzw. Pflanzenteile Gegenstand der Untersuchungen waren, gibt LACKMANN (1968)

für Haplppappusgewebekulturen an, dass Rotlicht völlig unwirksam war. Bei den mit demselben Gewebe fortgeführten Untersuchungen wurde erwartungsgemäss für die Induktion der PAL und die MDH-Aktivität der gleiche Befund erhalten.

3 Wochen altes Gewebe wurde in den Kulturröhrchen Hellrot- und Dunkelrotbestrahlung ausgesetzt, oder mit kombinierter Blaulicht und Rotlichtbestrahlung behandelt. Weder mit Rotlicht allein, noch in Verbindung mit Blaulicht oder Dunkelperioden konnte eine Förderung der PAL-Aktivität erreicht werden. Wurde 24 Stunden Rotlicht allein gegeben, so war gegenüber nicht bestrahltem Gewebe kein Unterschied in der PAL-Aktivität festzustellen, während zum Vergleich zur selben Zeit nur mit 24 Stunden Blaulicht bestrahlte Kulturen die übliche hohe Aktivität zeigten (Abb. 19). Gewebe, das nach 12 Stunden Blaulicht 15 Minuten Hellrot oder 15 Minuten Dunkelrot, oder kombiniert 15 Minuten Dunkelrot und 15 Minuten Hellrot und jeweils anschliessend eine 12stündige Dunkelperiode erhielt, wies gegenüber Gewebe, das nur 12 Stunden Blaulicht und 12 Stunden Dunkel erhalten hatte, keine signifikanten Unterschiede auf (Abb. 20).

Die auch in allen diesen Versuchen bestimmte MDH-Aktivität zeigte ebenfalls keine signifikante Reaktion auf Rotlicht verschiedener Qualität und Dauer.

6. PAL-Aktivität und Gehalt an Hydroxyzimtsäuren

Mit den bei DE STEVENS und NORD (1955), GEISSMAN (1955) und BEILSTEIN (1934) angegebenen Nachweisreaktionen für Hydroxyzimtsäuren und andere Phenylpropanverbindungen konnte keine der als Vergleichssubstanzen vorliegenden Säuren im alkoholischen Gewebeextrakt von Haplopappus allein nachgewiesen werden. Obwohl Kaffeesäure (= Dihydroxyzimtsäure) die Hauptmenge der Hydroxyzimtsäuren ausmacht (SUGANO und HAYASHI, 1967a), liegt sie doch als Gemisch mit anderen C_6-C_3-Abkömmlingen vor. Das am Beckman DK 2A aufgezeichnete

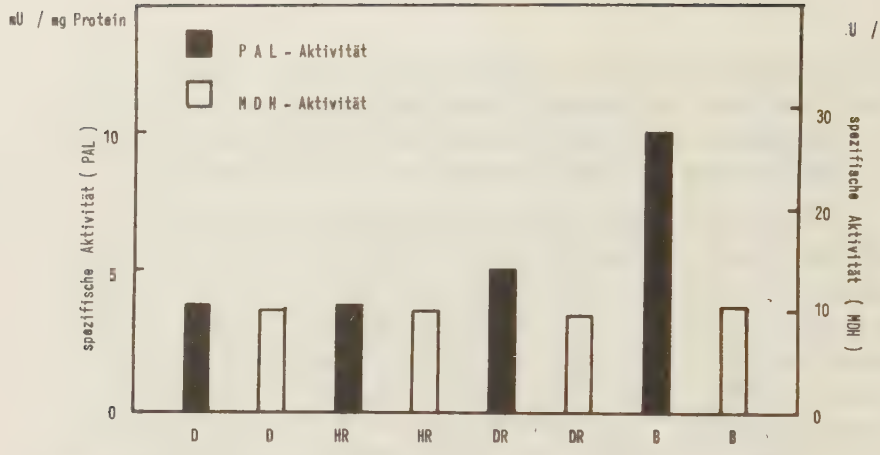


Abb. 19 : Einfluss von Blau- und Rotlicht auf die PAL - Aktivität (Gewebe nicht verstrichen, 3 Wochen alt). Zum Vergleich MDH - Aktivität in gleichbehandeltem Gewebe.

D : Dunkelkontrolle
HR : 24 Stunden Hellrot (660 nm, 2600 erg/cm^{2}sec)
DR : 24 Stunden Dunkelrot (740 nm, 2000 erg/cm^{2}sec)
B : 24 Stunden Blau (12 000 erg/cm^{2}sec)

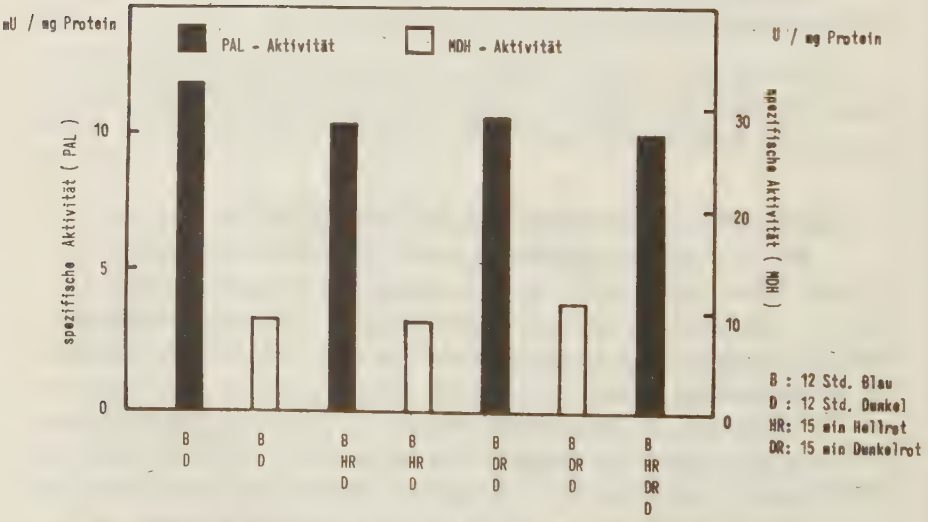


Abb. 20 : Einfluss von Bestrahlung mit Hellrot und Dunkelrot auf die PAL - Aktivität nach Induktion durch 12 Stunden Blaulicht. Nachfolgend 12 Stunden Dunkelbehandlung. Zum Vergleich MDH-Aktivität in gleichbehandelten Homogenisaten.

Extinktionsspektrum eines Gemischs gleicher Teile von p-Cumarsäure, Kaffeesäure, Ferulasäure, Dimethylkaffeesäure, Chlorogensäure, Gallussäure und Catechin ergab, verglichen mit den Spektren reiner Kaffeesäure und des alkoholischen Gewebeextrakts einen ähnlichen Verlauf. Die Maxima lagen zwischen 320 und 330 nm, die Minima bei 260-270 nm (Abb. 21). Die Extinktionsspektra von Extrakten unbehandelten Gewebes waren qualitativ gleich denen mit hohem Gehalt an Hydroxyzimtsäuren. Die relative Zusammensetzung der Extrakte bleibt demnach unverändert. (Abb. 22) .

Es wird im Folgenden nicht von Kaffeesäure allein (z.B. von ARDENNE, 1965), sondern von Hydroxyzimtsäuren (ENGELSMA, 1966, 1967) gesprochen.

Zur Bestimmung der Hydroxyzimtsäuren wurde etwa je 2 g 3 Wochen altes Gewebe in Petrischalen auf Agar verstrichen. Während ein Teil der Proben einer Blaulichtbestrahlung von 12 000 erg/cm^2sec bei 23° C ausgesetzt wurde, verblieben die restlichen Schalen im Dunkeln bei 23° C. In parallel laufenden Versuchen wurden alle 6-12 Stunden Proben entnommen und PAL, Hydroxyzimtsäuren und (bei den bestrahlten Proben) Anthocyan bestimmt. Da ja die Hydroxyzimtsäuren auch ein Mass für die im Gewebe vorhandene Aktivität der Zimtsäure-Hydroxylase darstellen (ENGELSMA, 1967), ergab sich hier die Möglichkeit, eine Verbindung zwischen der Induktion dieses Enzyms und der der PAL zu prüfen.

a.) Hydroxyzimtsäuren und PAL-Aktivität in unbestrahltem Gewebe

Im unbestrahlten Gewebe war nach dem Verstreichen sowohl bei der gemessenen Extinktion der Hydroxyzimtsäuren als auch bei der PAL-Aktivität ein signifikanter Anstieg zu beobachten. Vergleichbar mit den oben beschriebenen Versuchen stieg innerhalb von 30 Stunden die PAL-Aktivität

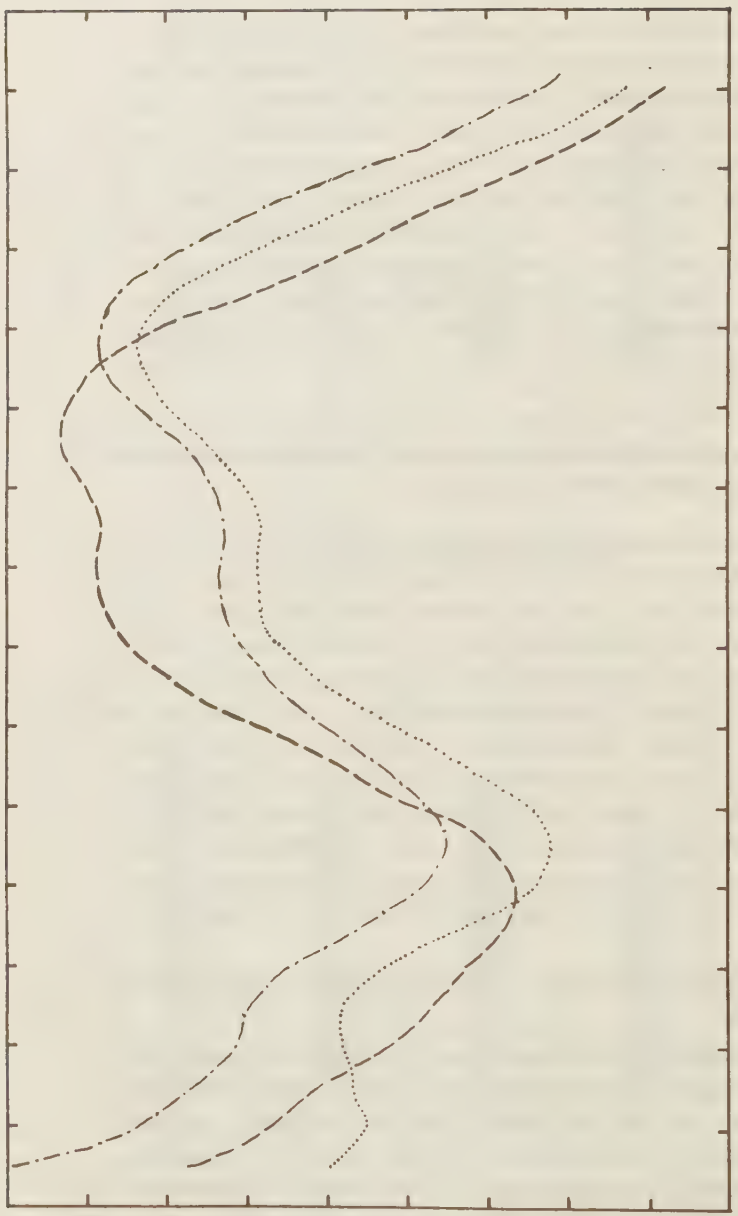


Abb. 21: Extinktionsspektren eines alkoholischen Gewebeextrakts und von Phenolcarbonsäuren.
— · — · — · — Gewebeextrakt
· · · · · · · · · Kaffeesäure
— — — — — Gemisch verschiedener Phenolcarbonsäuren

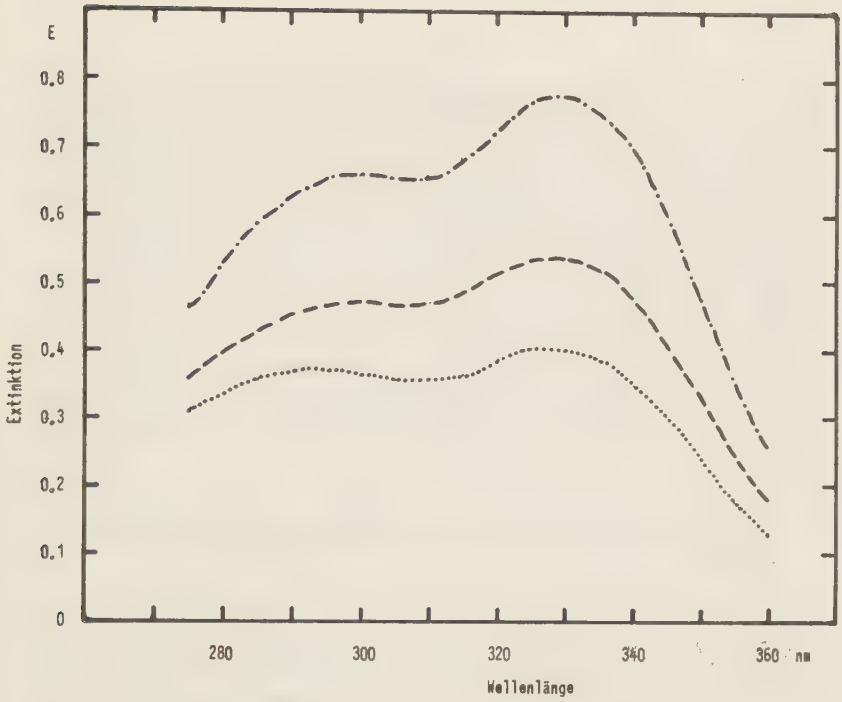


Abb. 22: Extinktionsspektren von Gewebeextrakten mit verschiedenem Gehalt von Hydroxyzimtsäuren.
(1 g Gewebe mit 5 ml Alkohol extrahiert; 0,1 ml Extrakt/ 3 ml alkohol. Lösung gemessen gegen Alkohol).

..... unbehandeltes Gewebe

— — — — 12 Stunden nach Verstreichen

—·—·— 30 Stunden nach Verstreichen

um 585 % an. In der gleichen Zeit wurde bei den Hydroxyzimtsäuren eine Zunahme von 175 % gemessen. Bei den danach bis 72 Stunden weitergeführten Versuchen wurden gleichbleibende PAL-Aktivität und eine nur unwesentliche Abnahme der Hydroxyzimtsäuren festgestellt. Wie aus Abb. 23 zu entnehmen ist, lief die Hydroxyzimtsäure-Synthese mit etwa 12-stündiger Verzögerung an und blieb dann etwa parallel zur PAL-Aktivität. Nach einer 24-stündigen Bestrahlung mit Blaulicht, die nach 36 Stunden Dunkel gegeben wurde, trat ein erneuter Anstieg der Hydroxyzimtsäuren um 350 % gegenüber dem Ausgangswert vor dem Verstreichen auf, während PAL unbeeinflusst blieb.

b.) Hydroxyzimtsäuren und PAL-Aktivität im bestrahlten Gewebe

Wie auch bei ENGELSMA (1967) für Cucumis-Keimlinge beschrieben, waren bei Bestrahlung der verstrichenen Gewebe der Anstieg der PAL-Aktivität und die Bildung der Hydroxyzimtsäuren zumindest in den ersten 48 Stunden gleich stark. Doch während ENGELSMA diese Veränderungen direkt der Bestrahlung mit Blaulicht zuschreiben konnte, war im vorliegenden Falle soweit kein Unterschied zu den unbestrahlten Gewebeproben festzustellen. Hatten die Hydroxyzimtsäuren im Dunkeln nach 30 Stunden um 175 % zugenommen, so konnte in den bestrahlten Proben nach 24 Stunden ein etwa vergleichbarer Wert von 130 % Zunahme gefunden werden. Ähnlich bei PAL: Dunkel 30 Stunden 585 % Zunahme, Blaulicht 24 Stunden 545 % Zunahme. Erst in der Spanne von 48 Stunden bis 60 Stunden war bei den bestrahlten Proben ein signifikanter Unterschied zu den unbestrahlten Proben ersichtlich. Die synthetisierten Hydroxyzimtsäuren stiegen jetzt auf eine um 540 % über dem Ausgangspunkt liegende Menge an, während die PAL-Aktivität gleich blieb (Abb. 24). Die starke Anthocyanzunahme in den bestrahlten Proben zwischen 42 und 48 Stunden schien ohne Einfluss auf die Hydroxyzimtsäuresynthese

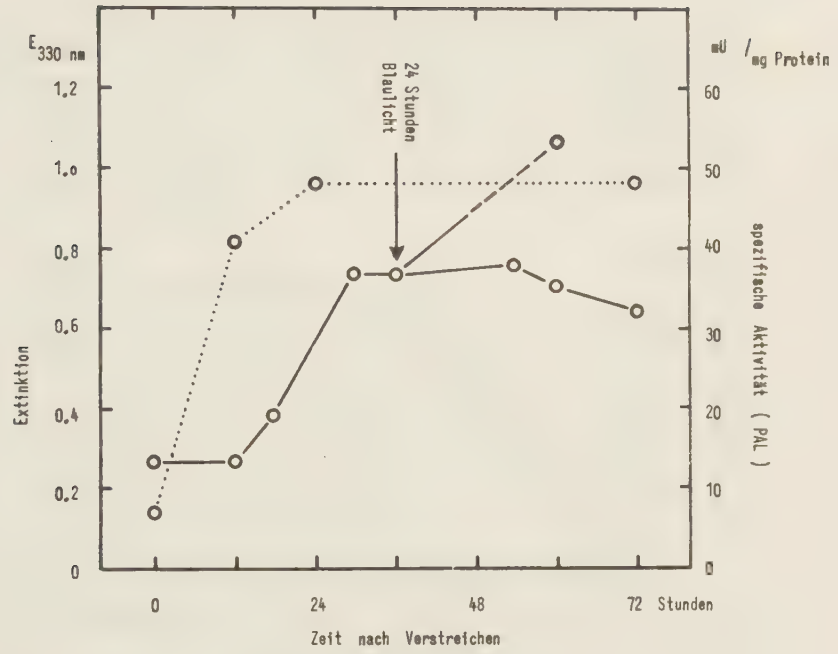


Abb. 23 : PAL - Aktivität und Hydroxyzimtsäuregehalt im Dunkeln, nach Verstreichen.

..... PAL - Aktivität

——— Hydroxyzimtsäuregehalt

——— — — nach 36 Stunden Dunkel im Blaulicht weiterlaufende Synthese von Hydroxyzimtsäuren

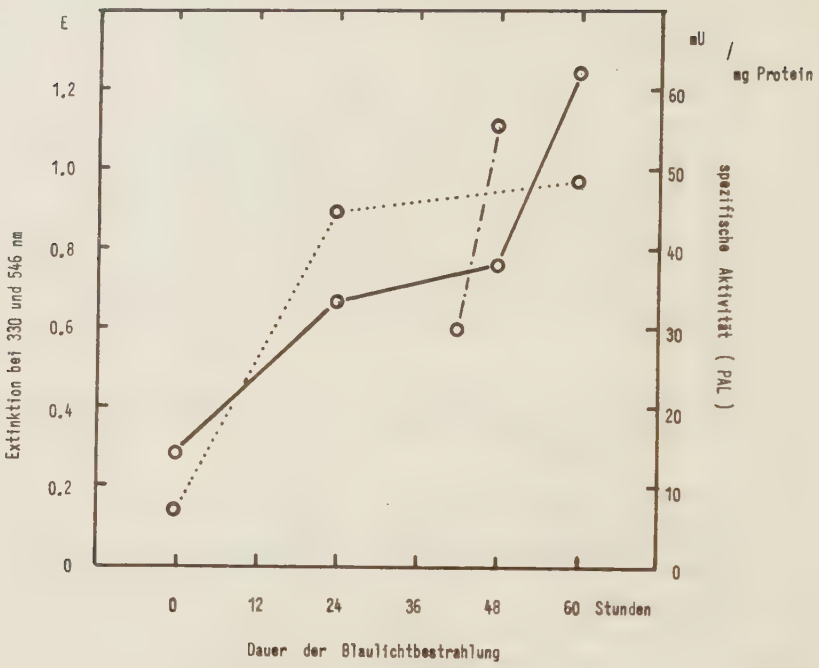


Abb. 24 : PAL - Aktivität, Anthocyan- und Hydroxyzimtsäuren-Synthese während der Bestrahlung mit Blaulicht. Induktion durch Verstreichen vor der Bestrahlung.

PAL - Aktivität

Hydroxyzimtsäuren

Anthocyan

zu sein, da ein erneuter starker Anstieg der Hydroxyzimtsäuren erst nach Einsetzen der Anthocyan-Synthese auftrat. Ausserdem war bei den unbestrahlten Proben nach 24stündiger Blaulichtgabe, die auf 36 Stunden Dunkel folgte, ohne Auftreten von Anthocyan eine Hydroxyzimtsäure-Zunahme auf denselben Endwert zu beobachten, wie bei den mit Dauerblaulicht behandelten Geweben.

7. Charakterisierung der PAL

Von verschiedenen Autoren wurden Untersuchungen zur Kinetik der PAL beschrieben. Obwohl die chemische Konstitution des Enzyms noch nicht geklärt ist, hat man doch schon zahlreiche Angaben über seine Eigenschaften. Da diese Angaben zum Teil stark divergieren, wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, für PAL aus Haplopappus einige Daten zu ermitteln. Bei derartigen Versuchen standen den Autoren meist beliebige Mengen proteinreichen Pflanzenmaterials zur Verfügung (ZUCKER,1965 und HAVIR und HANSON, 1968a: Kartoffelknollen, KOUKOL und CONN, 1961: Gerste), während für die hier angegebenen Ergebnisse langsamwüchsige, proteinarme Gewebekulturen verwendet wurden. Aus diesem Grunde mussten Reinigungsschritte unterbleiben. Durch Verwendung frischer Homogenisate sehr aktiver Gewebe konnte eine Störung der optischen Messungen vermieden werden.

a.) Ermittlung der Michaelis-Konstanten

Für die Ermittlung von K_m (MICHAELIS und MENTEN, 1913) wurden die bei der Inkubation des Homogenisats mit verschiedenen Substratkonzentrationen bei pH 8,8 und 40° C und Messung der Reaktionsgeschwindigkeit erhaltenen Werte im LINEWEAVER-BURK-Plot (LINEWEAVER und BURK, 1943) aufgetragen. Die Substratkonzentrationen pro ml Inkubationslösung wurden zwischen 10^{-3} und $2x10^{-2}$ Mol L-Phenylalanin gewählt, während die eingesetzte Menge Homogenisat mit 0,1 ml/ml Inkubationslösung gleichgehalten wurde. Die abgelesene Extinktions-

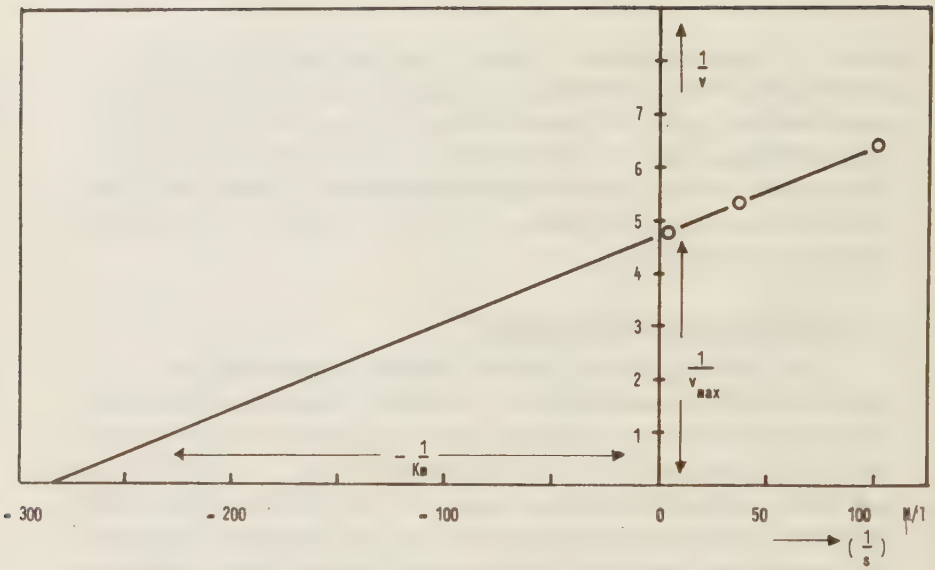


Abb. 25 : Ermittlung der Michaelis - Konstanten im Lineweaver - Burk - Plot.

Durch Inkubation bei 40° C und pH 8,8 mit verschieden hoher Substratkonzentration (s)
Ermittlung der jeweiligen Reaktionsgeschwindigkeit (v) als ΔE/Stunde bei 290 nm

änderung/Stunde bei 290 nm wurde als "v" in die Kurve eingesetzt. $-\frac{1}{K_m}$ konnte der Kurve entnommen und daraus K_m errechnet werden. Wie in Abb. 25 dargestellt, war $K_m = 0{,}0035 \times 0{,}1\ M = 3{,}5 \times 10^{-4}$ Mol. Sie lag damit nahe dem von MINAMIKAWA und URITANI (1965) für PAL aus Ipomoea angegebenen Wert von 1×10^{-4}.

b.) Hemmversuche

Bekanntlich kann PAL durch spezifische SH-Blocker gehemmt werden (HAVIR und HANSON, 1968b). Diese Hemmung ist nicht kompetitiv. Mit Jodazetamid konnte bei den vorliegenden Untersuchungen mit einer Konzentration von 10 µMol/ml Inkubationslösung bei einer Substratkonzentration von 5 µMol/ml ein untersuchtes Rohhomogenisat sehr aktiven Gewebes um 40 % gehemmt werden. Mit 1 mMol/ml Dichlofluanid (Fa. Bayer) wurde nach 30 Minuten Einwirkungszeit totale Hemmung erreicht. Durch Erhöhung der Substratkonzentration wurde die Hemmung nicht aufgehoben.

Tabelle 8: Konzentrationen je ml Inkubationslösung :

Substrat (Phenylalanin)	Inhibitor	Homogenisat	Aktivität (Δ E/h)
	Jodazetamid		
0,05 ml 0,1 M	0,1 ml 0,1 M	0,1 ml	0.300
0,05 ml 0,1 M	- - -	0,1 ml	0.480
0,5 ml 0,1 M	0,1 ml 0,1 M	0,1 ml	0.300
	Dichlofluanid		
0,5 ml 0,1 M	0,1 ml 0,01 M	0,1 ml	- (totale Hemmung)

Wegen der Notwendigkeit, bei der Gewinnung des Homogenisats SH-Stabilisatoren zuzugeben (ATTRIDGE und SMITH, 1967), musste die Ermittlung von K_i für SH-Blocker unterbleiben. Da für PAL eine hohe Substratspezifität angegeben wird (KOUKOL und CONN, 1961), wurde untersucht, ob das Enzym durch Substratanaloga kompetitiv gehemmt werden konnte. Bei einem Versuch mit L-Tyrosin (p-Hydroxyphenylalanin) konnte selbst bei einer Konzentration von $1,5 \times 10^{-3}$ M (Grenze der Löslichkeit) noch keine Hemmung nachgewiesen werden, während KOUKOL und CONN (1961) für eine Konzentration von 6×10^{-4} M schon 57 % Hemmung (kompetitiv) fanden.

c. Disc-Elektrophoretische Trennung der löslichen Proteine im Gewebehomogenisat

Von MINAMIKAWA und URITANI (1964) wurden bei der Reinigung der PAL zwei Fraktionen gefunden, die beide PAL-Aktivität aufwiesen. HAVIR und HANSON (1968) fanden bei der Disc-Elektrophorese zur Auftrennung der Proteine in gereinigten und rohen Enzymextrakten aus Kartoffelscheiben ebenfalls zwei Fraktionen, deren eine mit einem Molekulargewicht von etwa 300 000 sich bei Reinigung anreicherte, während sich im ungereinigten Extrakt noch eine Fraktion mit einem MG von etwa 600 000 befand.

Da 3,5 %iges Polyacrylamidgel mit einer Porenweite über 20 Å (WHITE 1960) für Moleküle über 1 000 000 und 7 %iges Gel für 300 000 durchlässig sind, wurden für die vorliegenden Untersuchungen diese beiden Gelkonzentrationen und eine zusätzliche Zwischenkonzentration von 5,25 % gewählt.

Wie aus Abb. 26 ersichtlich, war in allen Fällen nach dem Lauf, dem Zerschneiden und Inkubieren der Gele, in den Eluaten der Gel-Scheiben stets nur eine einzige Bande für PAL nachzuweisen. Eine Molekularbestimmung mit SDS-Gel (SDS = Zusatz von Sodiumdodecylsulfat zum Polyacrylamidgel)

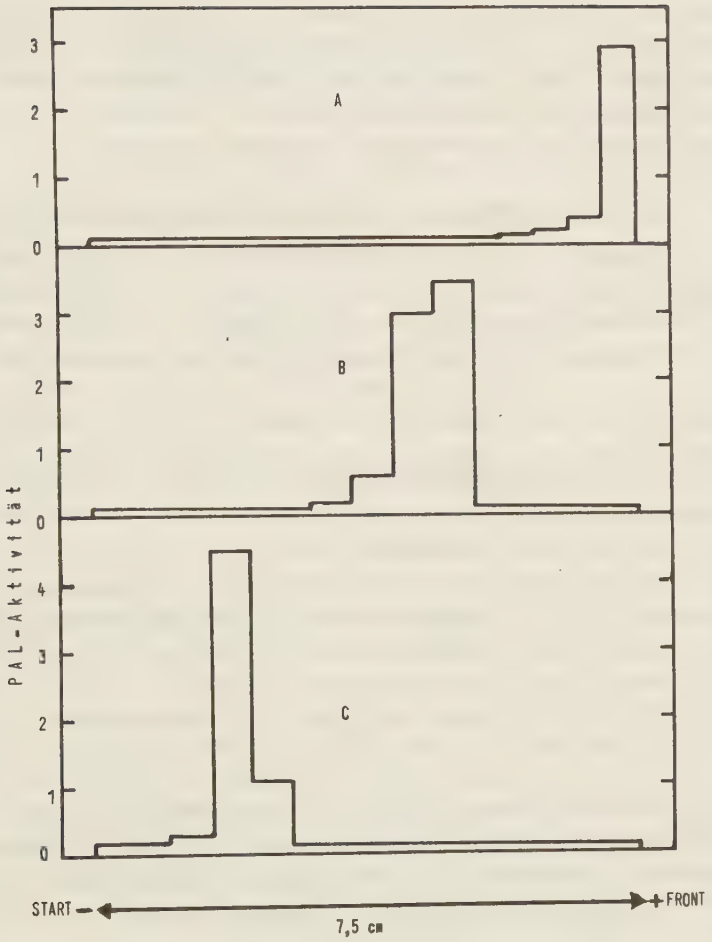


Abb. 26 : Verteilung der Banden mit PAL - Aktivität nach Disc - Elektrophorese in Polyacrylamid - Gelen verschiedener Porengrösse.

A : 3,5 %iges Gel

B : 5,25 %iges Gel

C : 7 %iges Gel

Länge der Gele 7,5 cm; Start ● , Front + .

musste unterbleiben, da inaktivierte PAL nicht mehr nachzuweisen ist. Das Molekulargewicht muss bei dem hier beschriebenen Versuch sicher unter 600 000 gelegen haben, da das Enzym im 7 % Gel, das für 300 000 durchlässig ist, noch ein Drittel der Laufstrecke zurückgelegt hat.

8. De-novo Enzymsynthese unter Einwirkung von Blaulicht

Während die PAL-Aktivität, bezogen auf Proteingehalt des Homogenisats, nach Übertragen auf frisches White-Nährmedium (siehe"Verstreicheffekt"S.34) innerhalb von 24 Stunden um 700 % zunahm, blieb der Proteingehalt des Gewebes gleich:

Tabelle 9: Proteingehalt und PAL-Aktivität in verstrichenem, bestrahltem Gewebe

	spez. Aktivität (PAL)	
Kontrolle	6,4 mU/mg Protein	284 µg Protein/ml Homog.
24 h Blau	44,7 mU/mg Protein	298 µg Protein/ml Homog.
Die Werte stammen von jeweils 4 Gewebeproben		

Zur Bestimmung wurden je 1 g Gewebe mit 1,5 ml Boratpuffer (pH 8,8) homogenisiert. 0,2 ml des Homogenisats dienten der PAL-Bestimmung, während in 0,5 ml die Proteinmenge bestimmt wurde (nach KJELDAHL).

Auch bei Untersuchungen,über einen längeren Zeitraum blieb der Proteingehalt etwa konstant, gegenüber einer sich ständig ändernden PAL-Aktivität im Homogenisat.

Tabelle 10: Proteingehalt und PAL-Aktivität im Gewebe während einer Kulturperiode

	vor Versuch	nach 1 Woche	nach 2 Wochen	nach 3 Wochen	nach 4 Wochen
Protein/ml Homogenisat	252,5 µg	251,6 µg	261,9 µg	276,9 µg	252 µg
PAL/mg Protein	4,4 mU	17,8 mU	9,0 mU	5,2 mU	4,4 mU

Den Angaben liegen 4 - 8 Versuche zugrunde

a.) Hemmung der PAL-Aktivität durch Puromycin und Actinomycin D

Um zu prüfen, ob es sich beim Anstieg der PAL-Aktivität um de novo-Enzymsynthese handelte, oder um Hemmung eines PAL-inaktivierenden Systems, wurden Versuche mit den Proteinsynthesehemmern Actinomycin D und Puromycin unternommen.

Jeweils 3 g Gewebe wurden in 10 ml White-Nährlösung suspendiert und während einer Blaulichtbestrahlung von 12 000 erg/cm^{2}sec 48 Stunden auf der Schüttelmaschine geschüttelt. Zur Hemmung der Proteinsynthese wurden 2-20 µg Actinomycin D (E.REICH et al. 1961 : 1 µg hemmt RNS Synthese), bzw. 30-100 µg Puromycin pro ml Nährlösung steril zugegeben. Nach 48 Stunden Einwirkungszeit wurden die Suspensionen filtriert und im Gewebehomogenisat die PAL-Aktivität bestimmt. In Tabelle 11 sind die Mittelwerte der Reaktionsgeschwindigkeit (Δ E/10 min) als Mass der Enzymaktivität angegeben (Abb. 27). Die Kontrollwerte stammen von Gewebe gleicher Behandlung, jedoch ohne Proteinsynthesehemmer.

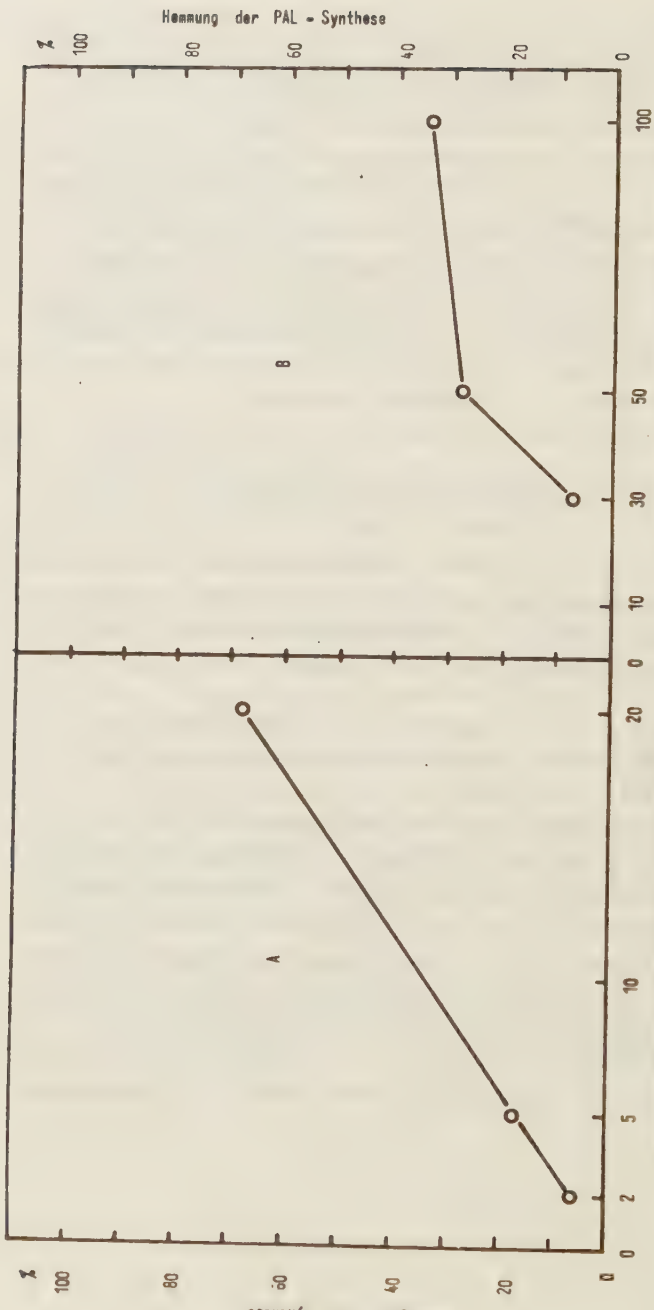


Abb. 27 : Hemmung der de - novo Enzymsynthese durch Actinomycin D und Puromycin in suspendierten Gewebekulturen während Blaulichtbestrahlung.

A : Hemmung durch Actinomycin D

B : Hemmung durch Puromycin

Tabelle 11: Hemmung der PAL-Aktivität		
Synthesehemmer/ml	Δ E/10 min	% Hemmung gegenüber Kontrolle
Kontrolle a	0.156	-
2 µg Actinomycin D	0.147	6 %
5 µg Actinomycin D	0.130	15,6 %
30 µg Puromycin	0.144	7,5 %
50 µg Puromycin	0.113	27,3 %
Kontrolle b	0.104	-
20 µg Actinomycin D	0.034	68 %
100 µg Puromycin	0.070	34 %
Den Angaben liegen je 2-3 Versuche zugrunde		
Δ E/10 min wurde bestimmt für 0,2 ml eines Homogenisats von 1 g Gewebe mit 1.5 ml Boratpuffer während der Inkubation mit 0,2 ml 0.1 m Phenylalaninlösung und 1.6 ml Puffer bei 40° C.		

b.) Hemmung der Synthese von Anthocyan und Hydroxyzimtsäuren durch Puromycin und Actinomycin D

Die Gewebe wurden wie im vorigen Versuch vorbereitet. Actinomycin D konnte in einer Konzentration von 2 µg/ml (= 2×10^{-6} g/ml) weder die Anthocyansynthese noch die der Hydroxyzimtsäuren hemmen, während Puromycin bei 30 µg/ml (= 3×10^{-5} g/ml) eine 14 %ige Hemmung der Anthocyansynthese bewirkte, aber auf die Hydroxyzimtsäuren keinen Einfluss ausübte.

c.) Versuch zum PAL-inaktivierenden System

Bestrahltes und unbestrahltes Gewebe wurde homogenisiert und die PAL-Aktivität bestimmt. Dann wurden beide Homogenisate gemischt und die Aktivität des Gemischs

gemessen. Das Homogenisat des unbestrahlten Gewebes hatte eine Aktivität von 3,6 mU/mg Protein, das des bestrahlten Gewebes 8,5 mU und das Gemisch 6,0 mU/mg Protein. Der errechnete Wert liegt bei 6,05 mU/mg Protein. Die Addition der Aktivität aus bestrahltem und unbestrahltem Gewebe wird auch bei SCHERF und ZENK (1967 b) und ENGELSMA (1967) als Beweis für das Fehlen eines PAL-aktivierenden oder inaktivierenden Systems angegeben.

In Haplopappusgewebe nimmt die PAL-Aktivität auch weiter zu, wenn nach 12-stündiger Bestrahlung mit Blaulicht eine Dunkelperiode folgt. Daraus ist zu schliessen, dass in Haplopappusgewebe kein "PAL-inactivating-system" vorkommt, wie es ENGELSMA (1970) z.B. in Cucumiskeimlingen nachwies.

Tabelle 12 : PAL-Aktivität im Dunkeln nach Blaulichtbestrahlung

Bestrahlung	PAL-Aktivität/mg Protein
12 h Blaulicht	8,5 mU
12 h Blaulicht, 12 h dunkel+)	13,5 mU
Dunkelkontrolle+)	3,8 mU

+) die Werte entstammen der Abb. 18 : Blaulicht und Dunkel

9. Hemmung der PAL-Aktivität und Anthocyansynthese durch Gibberellin

Durch Gibberellinsäure (GA_3) konnte, wie nach Untersuchungen von FURUYA und THIMANN (1964) für Spirodela und von ARDENNE (1965 unveröffentlicht) und LACKMANN (1968) für Haplopappus zu erwarten war, die Anthocyansynthese gehemmt, bzw. völlig unterdrückt werden. Wie bei LACKMANN angegeben, verhinderte eine Konzentration von 10^{-6} g/ml Nährlösung die Anthocyansynthese völlig. Wie dort angegeben, wurde auch bei den vorliegenden Versuchen

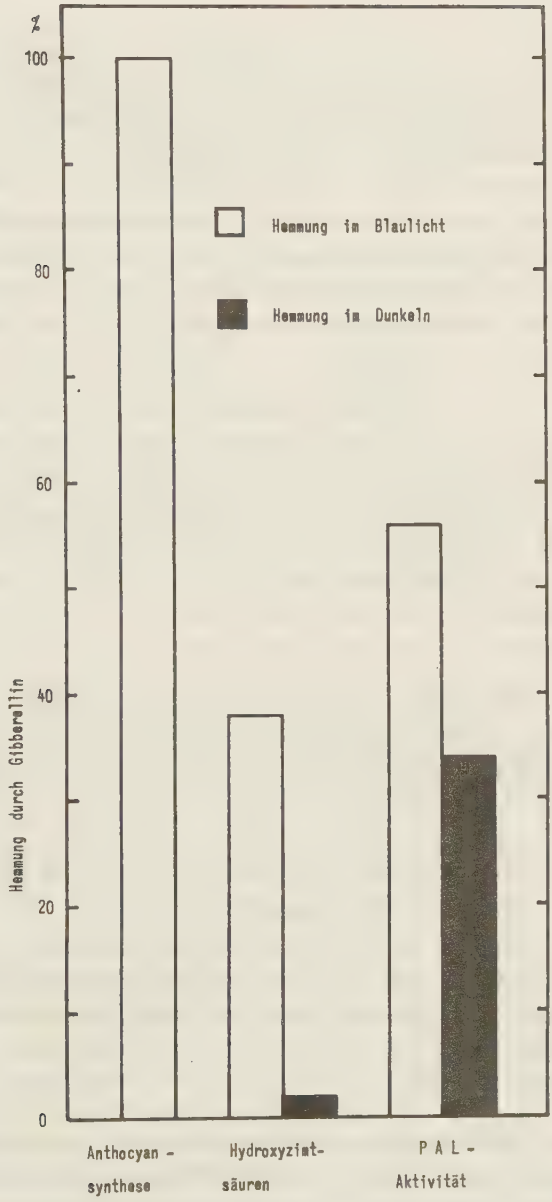


Abb. 28 : Einfluss von Gibberellinsäure (GA_3) auf die Synthese von Anthocyan, Hydroxyzimtsäuren und die PAL - Aktivität in suspendierten Gewebekulturen, Konzentration : 10^{-6} g / ml, Einwirkungszeit : 48 Stunden

die Gibberellinsäure dem Gewebe in flüssigem White-Medium steril zugegeben und die Kulturen während der Einwirkungszeit von 48 Stunden auf einer Schüttelmaschine geschüttelt. Zur gleichen Zeit wurden die Kulturen mit Blaulicht einer Intensität von 12 000 erg/cm^2sec bestrahlt bzw. zur Kontrolle im Dunkeln belassen. Bezugswerte wurden aus Kulturen ohne Gibberellin, aber mit gleicher Behandlung, bestimmt. Übereinstimmend mit obigen Autoren ergab sich bei den bestrahlten Kulturen eine 100 %ige Hemmung der Anthocyansynthese.

Bei der in den 48 Stunden bestrahlten Kulturen bestimmten PAL-Aktivität konnte eine 61 %ige und bei den Hydroxyzimtsäuren eine 38 %ige Hemmung ermittelt werden. Die im Dunkeln mit GA_3 behandelten Gewebe zeigten ähnlich wie bei Puromycin und Actinomycin eine wesentlich geringere oder gar keine Reaktion. Die PAL-Synthese war nur um 34 % gehemmt, bei den Hydroxyzimtsäuren war keine Hemmung festzustellen (Abb. 28).

Höhere Konzentrationen für Actinomycin, Puromycin und Gibberellinsäure, sowie Einfluss längerer oder kürzerer Bestrahlung konnten nicht mehr untersucht werden, da die Versuche aus technischen Gründen abgebrochen werden musste.

III. PAL-Aktivität und Anthocyansynthese in Suspensionskulturen von Haplopappus gracilis

Submerskulturen von Haplopappus haben gegenüber Schrägagarkulturen den Vorteil, dass sie wesentlich schneller wachsen (innerhalb einer Übertragungsperiode von 10 Tagen Zunahme von über 900 %) und sich auch leichter übertragen lassen.

Homogenisate von Suspensionskulturen enthielten etwa die fünffache Menge an löslichem Protein (ca. 1 mg/g Frischgewicht) bei etwa gleicher Synthesefähigkeit für Anthocyan.

Ein weiterer Vorteil ist darin zu sehen, dass Versuche mit Veränderung des Nährmediums schnell und bequem durchgeführt werden können. Daher wurden die Versuche auch besonders in diese Richtung ausgelegt.

Die spezifische PAL-Aktivität lag unter der von Kulturen auf Schrägagar, wenn sie in beiden Kulturen 10 Tage nach Übertragen bestimmt wurde. In einer vergleichenden Bestimmung wurden folgende Werte erhalten:

Submerskulturen	13,4 mU/mg Protein
Schrägagarkulturen	17,8 mU/mg Protein

Eine Änderung der spezifischen Aktivität von PAL war bei den Suspensionen während einer Kulturperiode nicht zu beobachten. Hemmender oder fördernder Einfluss von Blaulichtbestrahlung (12 000 erg/cm^2sec) war nicht festzustellen.

Der ständig gleichbleibende hohe Anthocyangehalt machte sich bei der Bestimmung der PAL-Aktivität störend bemerkbar. Da die Homogenisate stets alkalisch waren (Boratpuffer, pH 8,8) trat eine starke Verfärbung durch Phenolatbildung auf, die eine starke Verdünnung der Lösung erforderlich machte, oder dazu zwang, nach der bei den Methoden beschriebenen Weise einen Ätherschüttelgang durchzuführen.

Wie bei den Schrägagarkulturen schon festgestellt werden konnte, verhielten sich PAL-Aktivität und Anthocyansynthese in gewisser Beziehung fast proportional (siehe S.41). Auch bei Suspensionskulturen konnte nachgewiesen werden, dass bei geringerer PAL-Aktivität im Gewebe auch nur eine entsprechend geringere Ausbeute an Anthocyan zu erwarten war. Die Submerskulturen wiesen gewöhnlicherweise unveränderte PAL-Aktivität auf. Doch bei Veränderungen am Nährmedium konnte unterschiedlich starker Pigmentgehalt und eine in gleicher Weise veränderte PAL-Aktivität erreicht werden (Abb. 29).

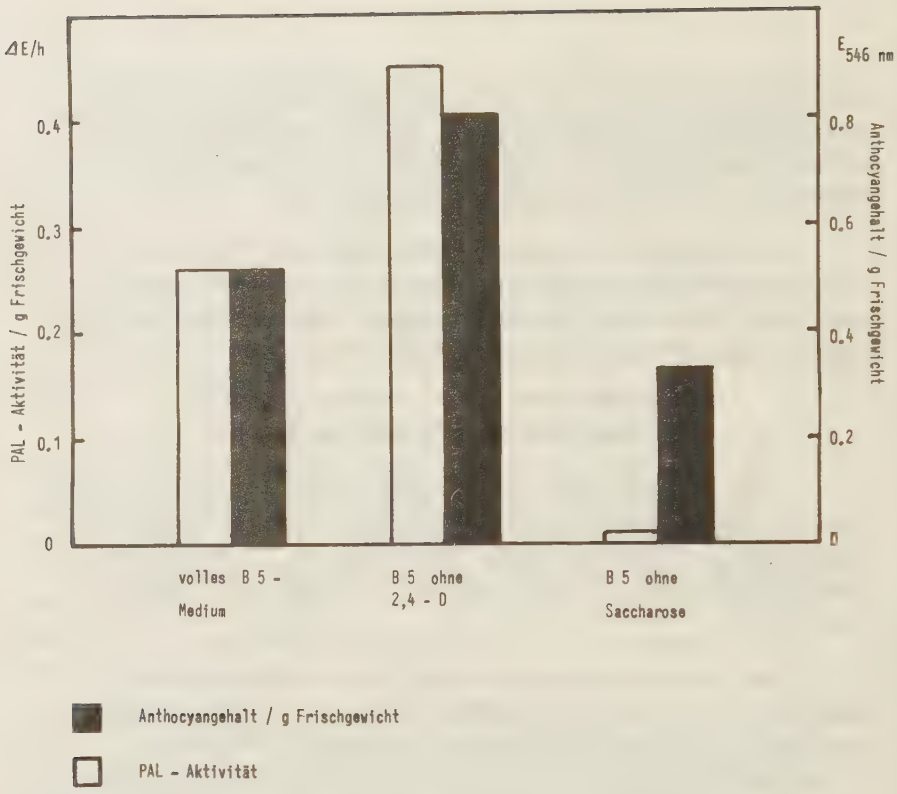


Abb. 29 : PAL - Aktivität und Anthocyangehalt von Suspensionskulturen in B 5 Medium nach Entzug von 2,4 - D bzw. Saccharose. (Dauerweisslicht 2000 lux) .

Da Gibberellinsäure (GA_3) bereits in Konzentrationen von 10^{-6} g/ml die Anthocyansynthese von Haplopappuskulturen auf White-Medium hemmte, wurde hier zusätzlich der Einfluss der 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) überprüft. Nach LACKMANN (1968) hat 2,4-D "in physiologischen Konzentrationen (10^{-10}-10^{-6} g/ml) keinen Einfluss auf die Anthocyansynthese". Bei den Submerskulturen jedoch wirkte sich ein Entzug von 2,4-D fördernd aus, sowohl auf die PAL-Aktivität, als auch auf die Pigmentbildung. 10 Tage nach Entzug des 2,4-D war ein um 60 % höherer Anthocyangehalt und eine um 73 % höhere PAL-Aktivität nachzuweisen. In diesen 10 Tagen hatten die Kulturen auch äusserlich ihren Habitus verändert. Ausser einer stärkeren Pigmentbildung fiel auf, dass die Zellen nicht mehr in kleinen Gruppen, sondern als grössere Aggregate im Medium trieben.

Der Entzug von Zucker liess das Wachstum der Kulturen stark zurückbleiben, führte zu einem Abfall der PAL-Aktivität bis zur Unmessbarkeit und liess die Anthocyansynthese fast zum Stillstand kommen. Die Tatsache, dass die Extinktion trotzdem noch relativ hoch war (Abb. 29) erklärte sich daraus, dass grössere Gewebeklumpen in der Kultur ihre Färbung länger behielten, als neu gebildete Zellen. Erst nach längerem Entzug des Energielieferanten waren alle Zellen farblos.

Ersatz des Zuckers als Energielieferant durch äquimolare Mengen von DL-Malat führte sofort zur Sistierung jeglichen Wachstums und der Syntheseprozesse im Gewebe. Bald darauf färbten sich die Kulturen braun und gingen ein. Trotz der relativ hohen MDH-Aktivität scheint Haplopappus nicht in der Lage zu sein, zugegebene äquimolare Mengen von DL-Malat als Energiequelle auszunutzen.

D. DISKUSSION

Der seit der Entdeckung der Phenylalanin-Ammonium-Lyase (KOUKOL und CONN, 1961) bei Hordeum für viele Objekte beschriebene Zusammenhang zwischen PAL-Aktivität und Anthocyansynthese (DURST und MOHR, 1966 a; SCHERF und ZENK, 1967 a,b) wurde bei Haplopappus auch von LACKMANN (1968) in Betracht gezogen. Entsprechende Untersuchungen liegen aber erst in der vorliegenden Arbeit vor. Bei dem Versuch, die für die Induktion der Anthocyansynthese in Kalluskulturen von Haplopappus bereits gefundenen Möglichkeiten auch auf die Induktion von Enzymen zu übertragen, die innerhalb des Biosyntheseweges des Anthocyans wirksam sind, erwies es sich aber als problematisch, direkte Beziehungen zwischen den vorliegenden und den bei LACKMANN für Anthocyan ermittelten Ergebnissen herzustellen. So zeigte sich, dass schon die einzige dort verwendete Bezugsgrösse für die Anthocyansynthese, die bestrahlte Oberfläche, bei Bestimmung der PAL-Aktivität nicht verwendet werden konnte. Die konstante Oberfläche für die Bestrahlungsversuche wurde nämlich durch Verstreichen des Gewebes erreicht, eine Behandlung, die die PAL-Aktivität im Gewebe bereits sehr stark förderte (Abb. 14).

Als Bezugsgrössen für die PAL-Aktivität wurden hier Frischgewicht, Protein und Malat-Dehydrogenase überprüft. Es musste darauf verzichtet werden, Bezugsgrössen anderer Autoren anzuwenden. Sie waren entweder zu aufwendig (Hexokinase SCHERF und ZENK, 1967 b), oder bei Gewebekulturen nicht anwendbar (Bezug auf Zahl der Pflanzenorgane - Hypokotyle, Kotyledonen o.ä.-). Die Vorteile von Keimlingen (hoher Proteingehalt und schnellere Reaktion auf Bestrahlung und andere Reize) wurden bei Verwendung von Gewebekulturen dadurch aufgewogen, dass nach der Wahl eines reaktionsfähigen Stammes durch die regelmässige Übertragung ein

relativ homogenes Gewebe ständig zur Verfügung stand,das besser vergleichbare Versuche gestattete.

Die bei LACKMANN ermittelte optimale Temperatur konnte bei den vorliegenden Versuchen nicht eingesetzt werden, da sich bei dieser Temperatur (28° C) das Gewebe und damit die daraus erhaltenen Homogenisate durch Phenole oft braun verfärbten, was sich durch Herabsetzen der Temperatur auf 23° C fast völlig verhindern liess. Das Herabsetzen der Temperatur auf 23° C hatte nur einen geringen Einfluss auf die Höhe der PAL-Aktivität, während die Zeit bis zum Erreichen einer maximalen PAL-Aktivität nach Bestrahlung in beiden Fällen gleich war (Abb. 12). Der Verlauf der PAL-Aktivität bei 23° und 28° entspricht etwa den Angaben von ENGELSMA (1968), der feststellte, dass der Q_{10} für die Phenolsynthese in dem Bereich von 18° - 32° C in Cucumis wider Erwarten kleiner als 2, fast sogar 1 war (Abb. 9 und 12).

In den Fällen, in denen trotz niedrigerer Temperatur eine zu starke Färbung des Homogenisats die optische Bestimmung im UV-Bereich behinderte, konnte durch Ausschütteln des Reaktionsprodukts (Zimtsäure) diese Störung umgangen werden. Bei dieser Methode ergab sich immer noch eine Ausbeute von 72 %, während z.B. AMRHEIN (1969) mit einer ähnlichen Methode nur 55 % vorgegebener synthetischer Zimtsäure wiederfand.

Bei Haplopappus-Gewebekulturen wird durch Blaulicht die Anthocyansynthese induziert (REINERT, CLAUSS u. ARDENNE, 1964). Der Feststellung von LACKMANN (1968), dass Gewebe "verschiedenen Alters" auf Bestrahlung mit Blaulicht in Hinsicht auf Anthocyansynthese gleichstark reagiert, kann nur bedingt zugestimmt werden. Bei den für verschiedene "Gewebealter" angegebenen Ergebnissen muss berücksichtigt werden, dass es sich nicht um absolute Angaben handelt, sondern jeweils um die Zeit seit dem letzten Übertragen des

Gewebes (maximal 4 Wochen), da ja diese Kalluskulturen seit Jahren gehalten werden. In der angeführten Arbeit von LACK-MANN wurde Gewebe 2, 3 bzw. 4 Wochen nach dem Übertragen vor der Bestrahlung auf Agarplatten verstrichen. Nach Ablauf des Versuchs wurde in allen Proben eine fast gleich-hohe Anthocyanmenge festgestellt. Wie bei dem Versuch zum Verstreicheffekt (S. 34) nachgewiesen werden konnte, übt Verstreichen auf frischem Agar einen sehr grossen Einfluss auf die PAL-Synthese aus. In diesem Versuch wurde ermittelt, dass nach dem Verstreichen die PAL-Synthese sehr stark ansteigt (Abb.13), um erst im Verlauf einer Übertragungsperiode wieder auf die ursprüngliche Aktivität zurückzugehen. Bei parallel durchgeführten Anthocyanbestimmungen war die Anthocyanmenge immer proportional der vorher erreichten PAL-Aktivität (Abb. 17). Es ist also erklärlich, dass gleichzeitig verstrichenes Gewebe in gleichem zeitlichem Abstand vom Verstreichen keine unterschiedliche Reaktion zeigen kann.

Eigene Versuche mit verschiedenaltem Gewebe, das auf seinem entsprechend alten Medium belassen wurde, zeigten, unabhängig davon, ob es vor der Bestrahlung verstrichen wurde oder nicht, einen unterschiedlichen Anstieg der PAL-Aktivität und, resultierend daraus, verschieden starke Anthocyansynthese (Abb. 17.).

Bei diesen Untersuchungen wurde deutlich, dass zwei Reize einen Einfluss auf die PAL-Synthese ausübten: Verstreichen verursachte einen mechanischen Reiz, durch Blaulicht wurde das Gewebe einem energetischen Reiz ausgesetzt. Abb. 17 zeigt die Auswirkung, die das Verstreichen auf altem Medium hervorruft. Die PAL-Aktivität war schon nach 12 Stunden deutlich höher als im unbehandelten Gewebe. ENGELSMA (1968) und AMRHEIN (1969), MINAMIKAWA und URITANI (1964) fanden entsprechende Reaktionen auf Verwundung.

NITSCH und NITSCH (1966) stellten fest, dass Topinambur nur nach Verletzung PAL synthetisiert und dass durch Licht eine weitere Förderung erreicht werden konnte. Auch in verletzten Haplopappuskeimlingen konnten von LACKMANN veränderte Bedingungen erreicht werden. Verletzte Zellen des Haplopappus-Keimlings waren befähigt, im Gegensatz zu Gewebe-Kulturen auch über einen Rotlicht-Photorezeptor zur Anthocyansynthese veranlasst zu werden.

Sicherlich stellt Verwundung (ENGELSMA, 1968; SCHERF und ZENK, 1967 b; AMRHEIN, 1969) einen wesentlich abrupteren und wirkungsvolleren Eingriff in die physiologischen Verhältnisse in einer Pflanze dar, als das Verstreichen einer Gewebekultur. Doch können, wie die Ergebnisse zeigen, auch die Veränderungen, die beim Verstreichen der Zellen entstehen, einen starken Reiz auf das Gewebe ausüben. Wenn die einzelnen Zellen und Zellaggregate der Gewebekultur mehrere Wochen in dichtem gegenseitigen Kontakt zueinander ungestört gewachsen sind, bedeutet das Auseinanderreissen durch Verstreichen, wie es ja das Ansteigen der PAL-Aktivität zeigt (Abb. 14), einen Eingriff in das Gleichgewicht, in dem sich die einzelnen Zellen zueinander über Wochen befanden und kann z.B. durch Veränderung des Ionenmilieus eine Störung des normalen Stoffwechsels hervorrufen.

Da ein Vergleich der PAL-Induktion durch Verstreichen und andere Reize einen weiteren Aufschluss über den Induktions- und Regulationsmechanismus der PAL und des Zimtsäure-Stoffwechsels versprach, wurde der Verstreicheffekt näher untersucht.

Verstreichen auf frischem Medium bedeutet einen zusätzlichen Reiz. Aus Abb. 17 geht hervor, dass Anthocyan und PAL nach Verstreichen auf frischem Medium in noch stärkerem Masse synthetisiert werden, als bei entsprechender Behandlung auf altem Medium. Auch hier war nach 48 Stunden die Menge gebildeten Anthocyans proportional der nach 24 Stunden nachgewiesenen PAL-Aktivität.

Bei diesen Versuchen kamen gleichzeitig drei Reize zur Auswirkung, die einzeln oder gemeinsam in der Lage waren, stets einen signifikanten Einfluss auf die PAL-Synthese auszuüben. Diese Reize waren mechanischer (Verstreichen), chemischer (frischer Nähragar) und energetischer (Blaulicht) Natur.

Es muss allerdings offen bleiben, ob die Reaktion (Anstieg der PAL-Aktivität) des alten Gewebes allein dem Verstreichen zugeschrieben werden kann, oder ob der durch dieses Verstreichen hergestellte Kontakt zunoch relativ unverbrauchtem, vorher unbewachsenem Medium dafür verantwortlich ist. In diesem Falle müsste dann ebenfalls ein chemischer Reiz angenommen werden.

Ein Einfluss von Blaulicht ist sowohl für die PAL- als auch für die Anthocyansynthese beschrieben worden. Hierbei handelte es sich stets um eine Förderung (ZUCKER, 1969; ENGELSMA, 1969; MOHR, 1957; GRILL, 1965 und AMRHEIN, 1969). Auch bei Haplopappus konnte die Anthocyansynthese (LACKMANN, 1968) und die PAL-Aktivität (Abb. 15) durch Blaulichtbestrahlung gefördert werden, wobei festgestellt wurde, dass die PAL-Synthese stets der Akkumulation des Pigments vorausging und in ihrem Umfang für die Syntheserate bestimmend war (Abb. 17). Wie aus den durchgeführten Bestimmungen hervorging, war die nach ca. 50 Stunden im Gewebe bestimmbare Anthocyanmenge direkt proportional der nach 24 Stunden gemessenen PAL-Aktivität.

Ein Vergleich der verschiedenen Reize (mechanisch, chemisch, Licht) und ihrer Auswirkung versprach einen weiteren Aufschluss über den Mechanismus der PAL-Induktion. Bei Bestrahlungsversuchen mit verstrichenem Haplopappusgewebe zeigte sich, dass auf altem Medium verstrichenes Gewebe nach Bestrahlung eine weitere Steigerung der PAL-Aktivität erfährt, während auf frischem Medium verstrichenes

Gewebe keine zusätzliche Förderung der dort sehr hohen PAL-Aktivität aufweist. Der Verstreicheffekt konnte also in seinerWirksamkeit durch Blaulicht noch gesteigert werden, doch beim Zusammentreffen des mechanischen und chemischen Reizes (frisches Medium) war durch Licht kein zusätzlicher Effekt mehr zu erreichen. Diese Effekte verhielten sich also nicht additiv. Möglicherweise steht der Pflanze nur ein bestimmtes "PAL-Reservoir" (AMRHEIN, 1969), bzw. nur eine begrenzte PAL-Syntheseleistung zur Verfügung. Wird durch einen Reiz (oder mehrere) dieses Reservoir erschöpft, so bleiben weitere ohne Einfluss. Der Effekt eines zweiten Reizes bleibt also umso geringer, je grösser die PAL-Induktion durch den ersten Reiz war. Befunde von ENGELSMA (1967) stützen diese Vermutung.

Bereits bei den Untersuchungen zur Anthocyansynthese wurden Überlegungen über die Natur des Photorezeptors für Blaulicht angestellt. Nach entsprechenden Beobachtungen an Rotkohl und Apfelschalen schlossen SIEGELMAN und HENDRICKS (1957) auf ein Flavoprotein, das der Acyl-CoenzymA-Dehydrogenase oder der Butyryl-CoA-DH ähnlich sei (SIEGELMAN und HENDRICKS, 1958).

Nur bei intakten Keimlingen (LACKMANN) und Gewebekulturen von Haplopappus, bei Sorghum (DOWNS und SIEGELMAN, 1963), Impatiens (ARNOLD, 1962) und Amaranthus (HEATH und VINCE, 1962) ist unter den verschiedenen Lichtquellen allein Blaulicht bei der Induktion der Anthocyan- und PAL-Synthese wirksam. Bei Cucumis (ENGELSMA, 1967) wird der Einfluss zwei verschiedener Pigmentsysteme für die Rezeption von Blau- und Rotlicht auf die PAL-Synthese beschrieben. Auch bei anderen Objekten wurde ein zweigipfliges Wirkungsspektrum mit hohem Energiebedarf für Anthocyan- oder PAL-Synthese gefunden. Für Rübenkeimlinge z.B. gaben SIEGELMAN und HENDRICKS die Maxima im Blau- und Rotlichtanteil des sichtbaren Lichts an. Bei der Rotlichtbestrahlung wurden verschiedenartige Wirkungen beobachtet.

MOHR und NES (1963), ENGELSMA und MEYER (1965) und HARRASCHAIN und MOHR (1963) wiesen bei Keimlingen ebenfalls den Einfluss von Rotlicht auf die Flavonoidsynthese nach. In den beschriebenen Versuchen zeigten MOHR und NES, sowie HARRASCHAIN und MOHR, dass Dunkelrotbestrahlung stets eine stärkere Pigmentbildung hervorrief, alsBlau- oder Hellrotbestrahlung. Übereinstimmend damit konnte von diesen Autoren für die PAL-Synthese eine gleiche Reaktion nachgewiesen werden. Durch 24 Stunden Dunkelrot wurde die PAL-Aktivität gegenüber der Kontrolle um 100 % gefördert. DURST und MOHR (1966 a), DOWNS und SIEGELMAN (1963), ENGELSMA und MEYER (1965) fanden einen stärkeren Hellroteffekt und eine Hemmung durch Dunkelrot. Sie konnten durch Dunkelrotbestrahlung zwar den Hellroteffekt fast vollständig umkehren, aber den Effekt einer vorausgegangenen Blaulichtbestrahlung nicht hemmen. DOWNS und SIEGELMAN konnten die Dunkelrothemmung durch Hellrotbestrahlung wieder aufheben und zeigten, dass dieser Vorgang reversibel war.

Aufgrund der Tatsache, dass Blau- und Rotlicht hoher Intensität Reaktionen auslöste, die durch geringere Intensitäten von Hell- und Dunkelrotlicht beeinflusst werden konnten, kam HARTMANN (1966) zu dem Schluss, dass auch diese "Hochenergiereaktion" vom Phytochromsystem gesteuert würde. Bekanntlich fungiert das Phytochromsystem in der Hauptsache als Photorezeptor für Hell- oder Dunkelrotlicht geringer Intensität. Dafür wurde u.a. von MOHR ein Schema entwickelt: "durch Hellrotbestrahlung wird inaktives Phytochrom $_{660}$ in aktives P_{730} überführt. Dieses kann dann durch 'differentielle Genaktivierung' auf die Flavonoidsynthese, als Beispiel einer "positiven Photomorphose" induktiv einwirken (MOHR und NES, 1963)". BOCK und HAUPT (1961) konnten durch Bestrahlen mit polarisiertem Hellrot und Dunkelrot nachweisen, dass Phytochrom oberflächenparallel im peripheren Cytoplasma in einer dichroitischen Struktur angeordnet ist.

Eindeutige Förderung durch das Phytochromsystem konnte z.B. bei Rübenkeimlingen (GRILL, 1965) nachgewiesen werden. Durch Hellrot bzw. Dunkelrot geringer Intensität liess sich die Anthocyansynthese reversibel fördern und hemmen.

Bei der Unterschiedlichkeit der Wirkungsspektren für die Hochenergiereaktion und Reaktionen wie bei Spirodela (FURUYA und THIMANN, 1964), die nur auf Rotlicht hoher Intensität, nicht aber auf geringere Energiegaben reagiert, scheint es nicht angemessen, von nur einem Photorezeptor für Rotlicht zu sprechen. In diesem Zusammenhang wurde von LACKMANN nach Auffinden von zwei Wirkungsmaxima für die Anthocyansynthese bei verwundeten Haplopappuskeimlingen und entsprechenden Versuchen mit Photosynthesehemmern für den Rotlichtbereich auch das Chlorophyll als Photorezeptor wahrscheinlich gemacht, während auch dort Blaulichtbestrahlung, unbeeinflussbar durch Rotlicht, vermutlich über ein Flavoprotein die PAL- und Pigmentsynthese induziert. Es erscheint jedoch sicher, dass in den Fällen, in denen durch Rotlicht geringer Energie die PAL- und damit Flavonoid-Synthese beeinflusst werden konnte, das Phytochromsystem dafür verantwortlich ist.

In anderen Fällen, in denen intakte Keimlinge auf Licht verschiedener Qualität reagierten und diese Reaktion offensichtlich auch vom Phytochromsystem gesteuert wurde, konnte nach Verwundung kein Einfluss des Phytochroms mehr gefunden werden (AMRHEIN, 1969).

Die Tatsache, dass Haplopappus-Gewebekulturen auf Hellrot- oder Dunkelrotbestrahlung weder mit Pigmentbildung (LACKMANN, 1968) noch mit Erhöhung der PAL-Aktivität (Abb. 19 und 20) reagieren, lässt verschiedene Erklärungen zu. BUTLER et al. (1963) beschrieben die Tatsache, dass

Phytochrom aus den im Dunkeln gehaltenen Maiskeimlingen verschwand, sobald sie Licht ausgesetzt wurden. Phytochrom fand sich nur in der inaktiven Form P_{660} in Dunkelkeimlingen. CHORNEY und GORDON (1966) entdeckten an Haferkeimlingen ein Verschwinden beider Formen von Phytochrom, sobald die Pflanzen mit Dunkelrot- oder Blaulicht bestrahlt wurden. Bei den vorliegenden Versuchen mit Haplopappus-Gewebekulturen konnte weder die Anthocyansynthese (LACKMANN) noch die PAL-Synthese durch Rotlicht jeder Qualität und Dauer gehemmt oder gefördert werden. Dies war unabhängig davon, ob die Kulturen vor der Rotlichtbestrahlung zur Enzyminduktion einer Lichtbehandlung hoher Intensität unterzogen worden waren, oder ob die Induktion durch mechanischen oder chemischen Reiz zustande gekommen war. Wenn die Annahme zugrunde gelegt wird, dass in dem Gewebe vorhandenes Phytochrom nach entsprechender Rotlichtbehandlung grundsätzlich immer regulierend in die Flavonoidsynthese eingreift, liegt es bei Fehlen einer solchen Wirkung nahe, zu behaupten, dass Phytochrom entweder durch Belichtung zerstört wurde (BUTLER et al.) oder aber in Haplopappus-Gewebekulturen ganz fehlt.

ZUCKER und LEVY (1959) beschrieben die Chlorogensäuresynthese in Kartoffelgewebe. Dabei wurde ein deutlicher Einfluss des Lichts nachgewiesen (ZUCKER, 1963). LEVY und ZUCKER (1960) stellten fest, dass Zimtsäure und p-Cumarsäureester als Zwischenprodukte der Chlorogensäuresynthese auftreten und formulierten ein Biosyntheseschema. ZUCKER (1965) zeigte, dass die Rate der Chlorogensäuresynthese direkt proportional zur PAL-Aktivität war und durch dieses Enzym die Regulierung der Synthese phenolischer Verbindungen im Gewebe erfolgte. Als weiteres Enzym in dieser Synthesekette wurde von AMRHEIN und ZENK (1970 a) Zimtsäure-4-Hydroxylase untersucht. ENGELSMA (1967) und AMRHEIN und ZENK erhielten einen parallelen Anstieg der lichtinduzierten Synthesen von PAL und Zimtsäure-4-Hydroxylase. Dieses Enzym befindet sich in direktem funktionellem Zusammenhang mit der PAL. Die mit Hilfe der Phenylalanindesaminase gebildete trans-Zimtsäure wird von der Zimtsäure-4-Hydroxylase zu p-Cumarsäure umgesetzt (AMRHEIN, 1969) und damit der Synthese weiterer Verbindungen als Substrat zugänglich gemacht (siehe auch Biosyntheseschema S. 3). ENGELSMA (1965) beschrieb die Akkumulation von Hydroxyzimtsäuren in Cucumiskeimlingen. Auch die Synthese dieser Verbindungen wurde, wie PAL, von Blaulicht induziert, und die Syntheserate dieser Verbindungen stand in eindeutiger Korrelation zur PAL-Aktivität (ENGELSMA, 1967).

Bei den eigenen Versuchen mit unbestrahltem Haplopappusgewebe konnte nach Verstreichen des Gewebes auf frischem Nährmedium ein Anstieg der PAL-Aktivität sowie der Synthese von Hydroxyzimtsäuren beobachtet werden. (Abb. 23). In Übereinstimmung mit den erwähnten Autoren war die Syntheserate dieser Verbindungen proportional zu dem Anstieg der PAL-Aktivität. Nach 48 Stunden, als keine weitere Zunahme der PAL-Aktivität mehr gemessen werden konnte, blieb auch die im Gewebe festgestellte Menge Hydroxyzimtsäuren etwa konstant. Diese Ergebnisse zeigen, dass auch die Zimtsäure-4-Hydroxylase, wie PAL, schon durch Verstreichen induzierbar ist.

Auch in Blaulicht-bestrahltem Gewebe verhielten sich die festgestellte Menge von Hydroxyzimtsäuren als Mass der Zimtsäure-4-Hydroxylase-Aktivität und die PAL-Aktivität, zumindest für die ersten 48 Stunden proportional zueinander. Erst nach weiterer Bestrahlung trat, etwa gleichzeitig mit beginnender Anthocyansynthese ein weiterer Anstieg der Hydroxyzimtsäuren auf (Abb. 24). Die PAL-Aktivität zeigte hierbei keine Veränderung. Das gleiche Ergebnis zeigte sich bei Blaulicht-Bestrahlung von 36 Stunden im Dunkeln gehaltenem, verstrichenem Gewebe. Der beobachtete weitere Anstieg der Hydroxyzimtsäuren war auch hier von keiner Zunahme der PAL begleitet.

ENGELSMA (1967) beobachtete den Verlauf der Synthese der Hydroxyzimtsäuren. 2 Stunden nach Beginn des Versuchs nahm der Gehalt an Hydroxyzimtsäuren für 6 Stunden zu, um dann auf einem gleichbleibenden Wert etwa konstant zu bleiben. Übereinstimmend mit den Befunden für die PAL-Synthese, die sich - wie gezeigt - auf mehrfache Weise stimulieren lässt, war bei Haplopappus die Synthese der Hydroxyzimtsäuren parallel mit der von PAL auch durch Verstreichen auf dem Medium und durch Blaulicht zu induzieren. Die für Blaulicht erhaltenen Werte stimmen nur z.T. mit den Ergebnissen von ENGELSMA (1967) überein, während sich die im Dunkeln ablaufende Hydroxyzimtsäuren-Synthese wie bei Cucumis in drei Stufen vollzog. Bei Haplopappus waren diese Stufen jedoch zeitlich länger. Die Verzögerung des Synthesebeginns betrug etwa 12 Stunden,und der Anstieg lief über 24 Stunden, bevor ein gleichbleibender Gehalt an Hydroxyzimtsäuren erreicht war.

Die Tatsache, dass ein Teil der Flavonoidsynthese auch im Dunkeln ablaufen kann, ist von HARRASCHAIN und MOHR (1963) bei Buchweizen nachgewiesen worden. AMRHEIN und ZENK (1970 b) stellten fest, dass bei Buchweizenkeimlingen nach Verletzung im Dunkeln die Synthese bis

zur Chlorogensäure läuft. Die ebenfalls im Dunkeln bis zu den Hydroxyzimtsäuren ablaufende Synthese bei Haplopappus bestätigt zum Teil diese Angaben. Es ergibt sich hier die Möglichkeit, die Biosynthese des Anthocyans auch bei Haplopappus in zwei Stufen einzuteilen, von denen, wie hier gezeigt, die erste auch im Dunkeln ablaufen kann (siehe Biosyntheseschema).

HESS konnte 1968 an Petunia zeigen, dass ein Angebot von Ferulasäure oder anderen Zimtsäurederivaten bei Petunia die Anthocyansynthese induzieren konnte. Auch andere Pflanzen können im Dunkeln Anthocyan bilden (Rotkohl) oder nach Verwundung dieses Pigment synthetisieren (EBERHARDT, 1954). Das Ausbleiben der Anthocyanbildung bei den vorliegenden Versuchen im Dunkeln zeigt aber, dass bei Haplopappus ein höheres Zimtsäure- oder Hydroxyzimtsäureangebot allein nicht ausreicht, um die Anthocyansynthese zu induzieren. Es müssen also zumindest bei Haplopappus auf dem Biosyntheseweg des Anthocyans noch weitere Enzyme liegen, die nur durch Licht induziert werden. Die Zimtsäure-4-Hydroxylase kann dabei sicher ausgeschlossen werden, da sie, gemessen an Folgeprodukten der von ihr katalysierten Reaktion - eine ähnliche Kinetik hat wie PAL und daher auch im Dunkeln induziert werden kann (Abb. 23 und 24).

Der bei den bestrahlten Geweben bestimmte Proteingehalt und die MDH-Aktivität in den entsprechenden Homogenisaten blieben während der Bestrahlungsversuche konstant. Man kann daraus ersehen, dass die Induktion der PAL ein sehr spezifischer Effekt ist, von dem nur ein kleiner Teil des Gesamtproteins erfasst wird und der auf andere grundlegende Stoffwechselvorgänge keinen messbaren Einfluss hat.

Bestrahlung von unverstrichenem Gewebe führte stets zu einer Induktion der PAL-Synthese (Abb. 15). Wurde jedoch nach 12 Stunden das Gewebe wieder dunkel gestellt, war ein weiterer starker Anstieg der PAL-Synthese zu beobachten (Abb. 18), während im Blaulicht belassene Gewebeproben nur einen geringeren Anstieg zeigten. ENGELSMA (1970) deutet dieses Phänomen bei Cucumis als Beweis für das Vorhandensein eines "PAL-inactivating-systems", im Gegensatz zu Untersuchungen an Rotkohl, wo die PAL-Aktivität abrupt zum Stillstand kommt, sobald das Licht entfernt wird. Aber wie bei Fagopyrum (SCHERF und ZENK, 1967 b) konnte auch für Haplopappus in den Gewebehomogenisaten aktiven und inaktiven Gewebes kein Anzeichen für ein "PAL-inactivating-system" gefunden werden. Die Aktivität beider Homogenisate addierte sich, wenn sie gemischt wurden, was auch von SCHERF und ZENK als Beweis der de-novo-Enzymsynthese und Fehlen von spezifischen Hemmstoffen der PAL-Aktivität angesehen wird. Ein weiterer Beweis konnte durch Untersuchung des Einflusses der Proteinsynthesehemmer Actinomycin D und Puromycin auf die PAL-Aktivität gefunden werden. Actinomycin D (REICH et al. 1961, 1967), das die Proteinsynthese auf der Basis der Transcription hemmt (RNS-Polymerasehemmer) wurde dem Nährmedium während der Bestrahlung über 48 Stunden hinzugefügt. Puromycin (Translationshemmer) kam auf die gleiche Weise zur Anwendung. Die in beiden Fällen erreichte Hemmung der PAL-Aktivität deutet direkt auf eine de-novo-Enzymsynthese. Es erscheint also sicher, dass der Anstieg der PAL-Aktivität nach Blaulichtbestrahlung bzw. nach anderen Reizen eine de-novo-Synthese darstellt und nicht den Abbau eines PAL-inactivating systems. Schwer erklärlich bleibt dagegen der Rückgang der Aktivität nach dem Maximum. ENGELSMA konnte diesen durch Zugabe von Proteinsynthesehemmern verhindern und nahm deshalb an, ein Protein werde synthetisiert,

das PAL nach Erreichen des Maximums hemme. Dafür konnte bei Haplopappus-Kalli in den Versuchen zur Addition der Aktivitäten von aktiven und inaktiven Homogenisaten allerdings kein Anzeichen gefunden werden (S. 59). Als mögliche Erklärung für den Aktivitätsabfall bleiben Proteinasen, die im Laufe der Zeit das Enzym in katalytisch inaktive Bruchstücke spalten. AMRHEIN diskutierte als weitere Möglichkeit, dass Isoenzymbildung (S. 54) für Aktivitätsanstieg und -rückgang verantwortlich sein könnten. Für beide Erklärungen gab es aber weder bei den von AMRHEIN beschriebenen, noch bei den vorliegenden Untersuchungen eindeutige Hinweise.

Haplopappusgewebe, das auf stickstoffreichem Nährmedium wuchs, hatte bei Blaulichtbestrahlung eine verlangsamte Anthocyansynthese gegenüber Gewebe, das auf stickstoffarmem Medium gewachsen war (LACKMANN). Der "hemmende" Einfluss des Stickstoffs im Medium scheint darauf zurückzuführen zu sein, dass bei hohem Angebot bevorzugt Proteinsynthese durchgeführt wird, während bei geringerem Gehalt die Anthocyansynthesekette mit Substrat (Phenylalanin) versorgt wird. Der Befund von EBERHARDT (1959), dass Protein- und Anthocyansynthese in Konkurrenz zueinander stehen, stützt diese Annahme. Nach Angaben von HESS (1968) für Petunia induziert z.B. Ferulasäure die Synthese eines Enzyms, das Ferulasäure zur Synthese des im B-Ring entsprechend substituierten Päonidins einsetzen kann. Demnach wäre es durchaus denkbar, einen ähnlichen Vorgang auch bei der Induktion der PAL-Synthese und Förderung der Anthocyansynthese durch Stickstoffentzug zu vermuten. Hier könnte Phenylalanin eine induzierende Wirkung ausüben.

Einen ähnlichen Einfluss wie der Stickstoffentzug hatte der Entzug von 2,4-D. Es konnte beobachtet werden, dass Veränderung der 2,4-D-Konzentration im Medium zwischen 10^{-10} und 10^{-6} g/ml Nährlösung (LACKMANN) keinen Effekt

zeigte. Völliger Entzug führte jedoch bei entsprechenden Versuchen mit Suspensionskulturen (Abb. 29) zu einer signifikanten Steigerung der Anthocyansynthese und der PAL-Aktivität. Versuche mit einem anderen, ebenfalls vom Stickstoffgehalt des Mediums beeinflussten Vorgang, der Embryogenese bei Karottenkulturen (TAZAWA und REINERT,1969), zeigten, dass 2,4-D-Entzug einen fördernden Einfluss auf die Embryogenese ausübte. Daraus wurde geschlossen, dass bei Karottenkulturen der Auxingehalt eine Kontrolle über den Stickstoffhaushalt des Gewebes ausübt. 2,4-D-Entzug könnte demnach auch bei Haplopappus über den Stickstoffhaushalt auf die Anthocyansynthese einwirken.

Ein Zusatz von 2,4-D kann bei verschiedenen Geweben Wurzelbildung und Lignifizierung unterdrücken (SIEGEL und PORTO, 1963). Bei anderen Autoren wird die Beziehung der PAL-Aktivität und der Anthocyansynthese zur Lignifizierung (RUBERY und FOSKET, 1969) und der Wurzelbildung (BACHELARD und STOWE, 1962) hervorgehoben. Möglicherweise sind auch hier die beobachteten Veränderungen im N-Stoffwechsel ausschlaggebend.

SUGANO und HAYASHI (1967 a) konnten nachweisen, dass Anthocyan in Karottengewebekulturen nicht allein über den Shikimisäure-Biosyntheseweg, sondern auch über den Acetat-Malonat-Weg verlaufen kann. Bei ihren Versuchen zeigten sie, dass 2,4-D nicht nur die Anthocyansynthese hemmte, sondern auch als Inhibitor des Acetat-Malonat-Biosyntheseweges auftrat. Ein Zusammenhang zwischen diesem Effekt von 2,4 D und der Förderung der Anthocyansynthese nach 2,4-D-Entzug bei Haplopappus soll hiernicht diskutiert werden. Weitere Untersuchungen der Biosynthese des Anthocyans bei Haplopappus insbesondere in Beziehung zu verschiedenen Wuchsstoffen könnten hier Klärung bringen.

In diesem Zusammenhang soll auch die Wirkung der Gibberellinsäure (GA_3) auf die PAL-Aktivität, die Anthocyan- und Hydroxyzimtsäuresynthese gesehen werden. In Abb. 28 werden die Versuche wiedergegeben, die sowohl im Dunkeln, als auch unter Blaulichteinfluss durchgeführt wurden. Eine Förderung der PAL-Aktivität, wie sie REID und MARSH (1969) beschrieben, konnte bei diesen Versuchen jedoch nicht gefunden werden.

REID und MARSH sehen in der Wirkung von GA_3 auf die PAL-Aktivität in Kartoffeln keine spezifische Reaktion,sondern eine generelle Reaktion des wachsenden Gewebes. Gibberellinsäure konnte die PAL-Aktivität nicht beeinflussen, wenn sie dem Homogenisat zugegeben wurde,und Licht konnte die Reaktion des Gewebes auf Gibberellin hinsichtlich der PAL-Aktivität weder fördern noch hemmen. Daraus wurde geschlossen, dass GA_3 nicht direkt auf PAL einwirkt, und die Reaktion lichtunabhängig war. Im Gegensatz dazu fanden CHENG und MARSH (1968) bei Pisum, dass Gibberellin in einer Konzentration von 10^{-5}- 10^{-4} M keinen Einfluss auf PAL ausübte, wenn die Pflanze im Dunkeln gehalten wurde. STAFFORD (1965) konnte durch Gibberellin (10^{-4} M) eine leichte Hemmung bei Phleum erreichen.

Bei Haplopappus wurde schon von ARDENNE (1964 unveröffentlicht) und LACKMANN (1968) eine sehr starke Hemmung der Anthocyansynthese durch Gibberellin ($3x10^{-6}$M) gefunden, und bei den vorliegenden Versuchen konnte dies auch für PAL und Hydroxyzimtsäure nachgewiesen werden. Hierbei war die Hemmung der Anthocyansynthese am stärksten (100 %). PAL wurde im Blaulicht um 60 % gehemmt und die Hydroxyzimtsäurensynthese im Blaulicht um etwa 40 %. Im Dunkeln konnte dagegen nur eine leichte Hemmung der PAL (35 %) und ein äusserst geringer Effekt auf die Hydroxyzimtsäurensynthese gefunden werden. Wie bei CHENG und MARSH war also die Hemmung im Blaulicht höher als im Dunkeln.

Wie von MÜNZEL (1969) am Beispiel der Amylase bei Begonia nachgewiesen und von THORPE und MURASHIGE (1968) für Nicotiana-Gewebekulturen postuliert wurde, ist der grundlegende Mechanismus derzahlreichen Gibberellineffekte auf das Wachstum und den Stoffwechsel in der Aktivierung verschiedener Hydrolasen zu sehen.

Da die Konzentration von GA_3, die bei Haplopappus die Anthocyansynthese bereits total unterdrückte, die PAL-Aktivität nur zu 35 % im Dunkeln bis 60 % im Blaulicht hemmte, scheint die Hauptwirkung erst nach der Umsetzung von Phenylalanin zu Zimtsäure aufzutreten und zwar auch erst zum geringen Masse auf der Stufe der Hydroxyzimtxäuren, wie aus der geringen Hemmungsrate der Synthese dieser Verbindungen hervorgeht (Abb. 28). Legt man zugrunde, dass nach Induktion der PAL- und Hydroxyzimtsäuren-Synthese durch mechanischen, chemischen oder Bestrahlungsreiz weiteres Blaulicht einen langsameren Anstieg der PAL-Aktivität und Hydroxyzimtsäuren bewirkt, als entsprechende Dunkelbehandlung (S.41), so war die von Gibberellin bewirkte Hemmung von PAL 35 %ig und die von Hydroxyzimtsäuren unter 5 %. Somit wäre der Ort der Gibberellin-induzierten Hemmung erst am Ende des Biosyntheseweges des Anthocyans zu vermuten.

Der enge Zusammenhang der Anthocyansynthese mit anderen für die Zelle bedeutungsvollen Stoffwechselvorgängen (Pentosezyklus, Tricarbonsäurezyklus, u.a., siehe Biosyntheseschema, S.3) legte nahe, zu untersuchen, inwieweit fördernde Eingriffe bei der Anthocyansynthese sich auch auf andere Vorgänge auswirkten. Aus diesem Grunde wurde der Einfluss von Rotlicht, Blaulicht, frischem Medium und Verstreichen auf die MDH-Aktivität geprüft. Die MDH stellt bekanntlich ein Schlüsselenzym für den gesammten Stoffwechsel der Pflanze dar, da sie an

zentraler Stelle, im TCC aktiv ist. Nach SUGANO und HAYASHI (1967 a,b) spielt sie ausserdem eine bedeutende Rolle ausserhalb des TCC, bei der Anlieferung von PEP (Phosphoenolpyruvat) für den Shikimisäure-Prephensäure-Biosyntheseweg des Anthocyans. Wie sich herausstellte, war die MDH-Aktivität in den entsprechenden Gewebehomogenisaten - gleichgültig, wie das Gewebe vorher behandelt wurde - unbeeinflussbar hoch. Der induzierende Effekt auf die Anthocyan- bzw. PAL-Synthese muss also entweder erst nach der Prephensäurestufe zur Auswirkung kommen, oder die normale, hohe MDH-Aktivität reicht auch bei der Förderung der Anthocyansynthese aus, um genügend C_2-Bausteine zur Verfügung zu stellen.

Da der Entzug der Saccharose aus dem Nährmedium erwartungsgemäss Wachstum und Pigmentsynthese der Gewebe sehr stark beeinträchtigte, wurde, in Hinsicht auf die nachgewiesene konstant hohe MDH-Aktivität, versucht, D,L-Malat anstelle von Saccharose als Energielieferanten einzusetzen. Entgegen dem erwarteten normalen Wachstum der Kulturen trat ein totales Erlöschen jeglicher Synthesetätigkeit im Gewebe auf, bevor sie schliesslich eingingen. Trotz hoher MDH-Aktivität ist Haplopappus anscheinend nicht in der Lage, äquimolare Mengen von D,L-Malat anstelle von Saccharose direkt zu verwerten.

SCHERF und ZENK (1967 a) fanden für Hexokinase ähnliche Ergebnisse. Wie die MDH bei Haplopappus, blieb bei Buchweizen dieHexokinase-Aktivität so konstant, dass sie bei SCHERF und ZENK als Bezugsgrösse eingesetzt werden konnte (MDH als Bezugsgrösse Abb. 11).

Im vorangegangenen Teil der Diskussion wurden die verschiedenen Möglichkeiten erörtert, die PAL-Synthese durch äussere Faktoren zu induzieren. Nunmehr soll versucht werden, zusammenfassend eine Erklärung zu finden, auf welche Weise es möglich ist, dass so unterschiedlich erscheinende Einflüsse, wie Bestrahlung und Verstreichen, am Ende den selben Effekt hervorrufen, nämlich eine Erhöhung der PAL-Aktivität. Die Anthocyansynthese soll hier nicht mit behandelt werden, da sie ja bei den meisten beobachteten Objekten erst über mindestens eine weitere, ausschliesslich lichtabhängige Stufe, durch die hier besprochenen Faktoren zu beeinflussen ist (HARRASCHAIN und MOHR 1963). Die chemischen Veränderungen am Nährmedium sind in diese Überlegungen ebenfalls nicht mit einbezogen worden, da sie im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen nicht in der Lage waren, PAL-Synthese zu induzieren, sondern auf die beschriebene Weise nur indirekt auf die Biosynthesekette des Anthocyans einwirkten.

Das Phytochromsystem hatte als Photorezeptor für Rotlicht, wie bereits erläutert, im vorliegenden Fall keine Wirkung auf die PAL-Synthese. Es kann hier jedoch wegen seiner allgemein beschriebenen Bedeutung für die Induktion dieses Enzyms bei Keimlingen und Pflanzenorganen mit einbezogen werden. Mit dem Phytochrom war es erstmalig gelungen, einen Photorezeptor zu identifizieren. Mit Methoden von SPRUIT (1966) konnte man in vivo Phytochrom bestimmen, und zuletzt haben BRIGGS et al. (1968) es aus der Pflanze extrahiert. Später gelang es, das Phytochrom in der Zelle im peripheren Cytoplasma an der äusseren Plasmamembran in einer dichroitischen Struktur zu lokalisieren (BOCK und HAUPT, 1961; HAUPT, 1968; ETZOLD, 1965).

Über den Photorezeptor für Blaulicht sind ebenfalls bereits Untersuchungen durchgeführt worden, die es ermöglichen, bisherige Vorstellungen über seine chemische Konstitution (SIEGELMAN und HENDRICKS, 1958) und seine

Lokalisation direkt in der äusseren Plasmamembran zu erhärten und seine Konzentration zu bestimmen ($2x10^{-7}$-$4x10^{-6}$, HERTEL, 1970). Die verschiedenen Vorgänge bei Lichteinwirkung auf die Pflanze konnten nunmehr genauer gedeutet werden.

Man kann also davon ausgehen, dass sich beide Photorezeptoren in, bzw. an der äusseren Plasmamembran befinden und von dort regulierend bzw. induzierend auf den Stoffwechsel einwirken. Eine direkte Wechselwirkung oder kooperative Beziehung zwischen den einzelnen Systemen, wie bei der Flavonoidsynthese besonders gründlich untersucht, erfordern aber darüber hinaus, dass diese direkt benachbart sein müssen. Vorstellungen von MOHR über primäre Genaktivierung, wie sie bisher nur bei Bakterien nachgewiesen werden konnten (JACOB und MONOD, 1960) setzen demgegenüber voraus, dass der Rotlicht-Rezeptor in der Kernmembran lokalisiert ist, da er direkt auf das entsprechende Gen wirken soll. Ein Zusammenwirken durch gegenseitige Förderung und direkte Einwirkungen des einen Rezeptorsystems auf das andere, wie durch Hemmung oder Aufhebung der PAL-Induktion nach Blaulichtbestrahlung mit Hilfe nachfolgender Rotlichtbestrahlung, oder ähnliche Effekte bei der Blau- oder Rotlichtgesteuerten Koleoptilenkrümmung (BLAUW, 1961; WILKINS, 1964), weisen jedoch eindeutig auf nahe räumliche Beziehungen zwischen den Photorezeptoren hin. In den Fällen, in denen kein Rotlichteinfluss auf Blaulicht-induzierte Vorgänge zu beobachten war, muss nicht unbedingt eine räumliche Trennung der Pigmentsysteme vorliegen, sondern eher eine zu geringe Konzentration oder gänzliches Fehlen von Phytochrom.

Die Anregung des Photorezeptors durch einen entsprechenden Reiz führt, begünstigt durch die Lage des Rezeptors auf der Membran, zu einer Veränderung der

Permeabilität der Plasmamembran. Entsprechende Untersuchungen über Permeabilitätsänderung nach Rot- bzw. Blaulichtbestrahlung zeigten erhöhten Stofftransport in einer Richtung, die von der des einfallenden Lichts bestimmt wurde (BLAUW, 1961; WILKINS, 1964). Besonders eindrucksvoll zeigten Untersuchungen von TANADA (1968) eine vom Phytochrom hervorgerufene rapide Veränderung der Membranstruktur, der er einen erhöhten Abtransport von Protonen zuschreibt. Da Membranen keine statischen Strukturen darstellen, sondern einen eminent dynamischen Aufbau haben, ist auch ihre Permeabilität nicht statisch. Ausser durch Licht konnte eine Permeabilitätsänderung auch durch mechanischen Reiz erreicht werden. Bei Verwundung wird die Zelle meist so stark geschädigt, dass die Fähigkeit zur selektiven Permeabilität leidet und die Diffusionsbarrieren mehr oder weniger zusammenbrechen. Nach leichtem mechanischem Reiz konnten JAFFE und GALSTON (1967) und GALSTON (1969) im Rahmen ihrer Untersuchungen zur Flavonoidsynthese bei Pisum eine drastische Permeabilitätsänderung der Plasmamembran beobachten, die begleitet war von einem Anstieg der ATPase und so den anorganischen Phosphatlevel anhob. Auch hier wurde eine rasche Erniedrigung der (H^+)-Konzentration beobachtet. Wenn schon ein leichter mechanischer Reiz die Membranpermeabilität verändern kann, so ist dies auch bei Verstreichen einer Gewebekultur zu erwarten.

Generell kann also festgestellt werden, dass verschiedene äussere Reize den gleichen Effekt auslösen, und zwar die Veränderung der Permeabilität des Plasmalemmas. Durch die Veränderung oder sogar Aufhebung der Diffusionsschranken (bei zu starkem Reiz) kommt es zu einer Änderung des Ionenmilieus in der Zelle. Hierbei wird der starke Effekt des Verstreichens auf frischem Medium gegenüber gleicher Behandlung auf altem Medium besonders deutlich. Die veränderten chemischen Bedingungen in der

Zelle (GALSTON, 1969) führen zu einer Induktion der PAL-Synthese und somit zur Synthese von C_6-C_3-Körpern. Die von SCHERF und ZENK (1967 a) beschriebene gleichbleibende Hexokinase-Aktivität während gleichzeitiger starker PAL-Synthese und die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Befunde für MDH zeigen, dass diese beidenEnzyme im Gegensatz zu PAL zu spezifisch an bestimmte komplexe Stoffwechselvorgänge gebunden sind, um auf derartige Reize zu reagieren. Die PAL-abhängige Synthese der C_6-C_3-Abkömmlinge übt wiederum eine signifikante Rolle bei der Kontrolle der Membranen aus (GALSTON, 1969).

Somit ist bei der Induktion der PAL-Synthese nur ein Faktor direkt wirksam (Ionenmilieu), während äussere Reize nur sekundär über diesen zur Auswirkung kommen. Bei der gezeigten kooperativen Wirkung ist es also gleichgültig, welcher Reiz hauptsächlich ausgeübt wurde, da auf jede Weise eine gegenseitige Beeinflussung stattfindet und das Ausmass der PAL-Synthese von der Höhe des Gesamtreizes abhängt.

Die Tatsache, dass die PAL-Aktivität nach Bestrahlung, Verstreichen und nach chemischem Reiz zunahm, jedoch nach Erreichen eines Maximums wieder absank (Abb. 14 und 15) wurde von SCHERF und ZENK (1967 b) mit der Möglichkeit einer Isoenzymbildung erklärt. Die häufigste Methode zur Trennung von Isozymen ist die Disc-Elektrophorese in Polyacrylamidgel (S. 54). Für den Versuch, Isozymbanden nachzuweisen, wurden Gele verschiedener Konzentration herangezogen (3,5; 5,25; 7% Polyacrylamid). Aufgrund der verschiedenen Porengrössen konnte somit eine optimale Aussage erwartet werden. PAL liess sich im Gel nicht spezifisch anfärben. Bei der generellen Anfärbung von Proteinen mit Amidoschwarz wäre, wegen der geringen spezifischen Aktivität, keine PAL-Bande aufgetreten, Daher mussten die Gele zum Nachweis von Banden mit PAL-Aktivität in Scheiben zerschnitten und in diesen Scheiben durch Inkubation mit L-Phenylalaninlösung, anhand der messbaren Zimtsäuresynthese, die PAL-Aktivität bestimmt werden. Es ergab sich, dass in allen Fällen nur in je einer Bande PAL-Aktivität vorhanden war (Abb. 26).

MINAMIKAWA und URITANI (1964) konnten bei der Reinigung eines Rohextraktes aus Süsskartoffelwurzel zwei Fraktionen trennen, die beide PAL-Aktivität hatten. HAVIR und HANSON (1968 a) fanden in Rohextrakten von bestrahlten Kartoffelscheiben zwei stabile Formen von PAL. Der einen, mit 90 % der Gesamtaktivität, wurde ein Molekulargewicht von ca. 330 000 und der anderen ein etwa doppelt so hohes zugeschrieben. Bei Reinigung des Extrakts konnten sie eine Anreicherung der kleineren Form erreichen. Nach Gel-Chromatographie mit Sephadex G-200 erhielten sie nur die eine Form, die das Molekulargewicht von 330 000 hatte. HAVIR und HANSON vermuten, dass die Form mit dem höheren Molekulargewicht aus 2 Molekülen der kleineren Form besteht. Sie erklären den Rückgang der PAL-Aktivität nach Erreichen des Maximums nach der Induktion mit dem Auftreten von chemischen Bindungen zwischen je 2 PAL-Molekülen.

Durch Verwendung von Polyacrylamid-Gelen mit Porengrössen von etwa 15 - 20 Å (WHITE 1960) sollte bei den vorliegenden Versuchen erreicht werden, dass Moleküle von 300 000 bis 1 000 000 bei der Trennung erfasst wurden. Der Versuch wurde allein unter dem Gesichtspunkt durchgeführt, dass festgestellt werden sollte, ob die in Haplopappus aktive PAL in einer, oder mehreren Formen mit sehr unterschiedlichen Molekulargewichten auftrat. Bei einem so begrenzten Anspruch an die Genauigkeit der Methode konnte auf die Berücksichtigung der Ladung des PAL-Moleküls bei der Disc-elektrophoretischen Trennung verzichtet werden. Eine Trennung mit SDS-Gel zur genauen Analyse des Molekulargewichts konnte nicht durchgeführt werden, weil inaktivierte PAL nicht mehr nachzuweisen ist. Da bei HAVIR und HANSON die 2 verschiedenen PALBanden nur in wenig gereinigten Präparationen auftraten und bei Reinigung sich nur eine Form anreicherte, wurde zur Trennung Rohhomogenisat von Haplopappus verwendet. Um Aktivitätsverluste während des Laufes zu verhindern, wurde als Stabilisator Mercaptoäthanol zugegeben und die Elektrophorese zur Vermeidung von Hitzeinaktivierung des Proteins mit pulsierendem Gleichstrom bei konstanter Leistung durchgeführt. Bei allen 3 Gelkonzentrationen konnte nur je eine Bande mit PAL-Aktivität nachgewiesen werden (Abb.26). In einem 3,5 %igen Gel mit einer Durchlässigkeit für Moleküle der Grössenordnung bis 1 000 000 hätte eine PAL von 600 000 mit Sicherheit nachgewiesen werden können, während sie in 7 %iges Gel nicht mehr eingedrungen wäre. Die aus dem Haplopappus-Gewebehomogenisat gewonnene PAL-Fraktion scheint aber eher zu der von HAVIR und HANSON mit einem Molekulargewicht von ca. 330 000 angegebenen Grössenordnung zu gehören, da sie auch im engporigen Gel nachweisbar war und in der selben Zeit im grossporigen Gel schon fast durchgelaufen war. Isozymbanden konnten bei diesen Untersuchungen nicht gefunden werden.

Bestimmungen der Michaelis-Konstanten im Rohhomogenisat können bekanntlich mit Fehlern behaftet sein. Da aber bei der Überprüfung der Bestimmungsmethode für PAL bereits die optimale Inkubationstemperatur und der optimale pH während der Messung für das Rohhomogenisat bestimmt waren (Abb. 8 und 10), wurden die Versuche zur Kinetik auch damit durchgeführt. Die Angaben für die K_m von PAL aus verschiedenen Objekten schwanken zwiwchen $4x10^{-5}$ bei Fagopyrum (AMRHEIN, 1969) bis $1,7x10^{-3}$ bei Hordeum (KOUKOL und CONN, 1961). Bei MARSH, HAVIR und HANSON (1968) wird für PAL aus Maiskeimlingen beschrieben, dass das Verhältnis zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Substratkonzentration nicht der Michaelis-Menten-Gleichung folgt. Durch Bestimmungen mit Konzentrationen nahe der Substratsättigung einerseits und mit sehr geringen Konzentrationen andrerseits ermittelten sie Werte zwischen $2x10^{-4}$ und $7x10^{-4}$. Die für Haplopappus im Rohhomogenisat ermittelten Werte bei Substratkonzentrationen von 10^{-3} bis $2x10^{-2}$M ergaben im Lineweaver-Burk-Plot eine Gerade (Abb. 25). Die daraus ermittelte Michaelis-Konstante von $3,5x10^{-4}$M/l liegt nahe den für andere Objekte bestimmten Werten ($1x10^{-4}$, Ipomoea,MINAMIKAWA und URITANI, 1965; 2,6-3,8 x 10^{-4}, Solanum, HAVIR und HANSON, 1968 b).

E. ZUSAMMENFASSUNG

Die Aktivität der Phenylalanin-Ammonium-Lyase (E.C.4.3.1.5.) konnte anhand der nach Inkubation mit Phenylalanin gebildeten Zimtsäure entweder durch optische Bestimmung im Homogenisat direkt verfolgt, oder nach Ausschütteln des Reaktionsprodukts bestimmt werden. Auf diese Weise war eine Störung der Messung durch zu starke Färbung des Homogenisats zu umgehen.

Gewebekulturen von Haplopappus auf festem Nährboden und Suspensionskulturen verhielten sich unter den gegebenen Versuchsbedingungen gleichartig. PAL-Aktivität war stets vorhanden, wurde jedoch durch verschiedene Faktoren mehr oder weniger stark beeinflusst. Ein Temperaturunterschied von 5° C während des Versuches zeigte keine signifikante Veränderung der Reaktion auf einen Reiz. Während einer Übertragungsperiode war sowohl eine starke Veränderung der PAL-Aktivität im unbehandelten Gewebe, als auch eine verschieden starke Reaktionsfähigkeit des Gewebes auf äussere Reize zu beobachten. Die Erhöhung der Aktivität um 700 % nach Übertragen auf frisches Medium wurde nur zum Teil durch den mechanischen Reiz des Verstreichens verursacht. Wie entsprechende Behandlung von Gewebe auf altem, seit vier Wochen bewachsenem Nähragar zeigte, kommt ein chemischer Reiz durch das frische Medium zusätzlich zum Verstreicheffekt zur Auswirkung.

Bestrahlung von Haplopappus-Gewebekulturen mit Blaulicht hoher Intensität führte innerhalb von 48 Stunden zu einem 400 %igen Anstieg der PAL-Aktivität, die anschliessend nachliess. Blaulichtbestrahlung konnte die PAL-Aktivität nicht weiter erhöhen, wenn in dem Gewebe durch vorheriges Verstreichen auf frischem Medium eine hohe Aktivität induziert worden war, jedoch nahm die Reaktionsfähigkeit

mit dem zeitlichen Abstand vom Verstreichen im Laufe von drei Wochen ständig zu. In allen Bestrahlungsversuchen wurde eine direkte Proportionalität zwischen der PAL-Aktivität 24 Stunden nach Einsetzen des zusätzlichen Reizes und der nach 50 Stunden bestimmten Anthocyanmange festgestellt.

Nach Induktion der PAL-Synthese durch Blaulicht stieg die Aktivität auch im Dunkeln weiter an. Weiteres Blaulicht ergab immer eine geringere Aktivitätszunahme, als die Dunkelbehandlung.

Die Einteilung der Anthocyansynthese in mindestens zwei Stufen konnte durch Bestimmung der Zimtsäure-Derivate im Gewebe bestätigt werden. Die erste Stufe, die auch die Hydroxy-Zimtsäuren einschliesst, konnte auch im Dunkeln ablaufen, während die zweite unbedingt lichtbedürftig war. Die Zimtsäure-4-Hydroxylase war mit den gleichen Methoden induzierbar, wie PAL.

Durch Rotlicht verschiedener Qualität (660 und 740 nm) und Dauer konnte kein Einfluss auf die PAL- und Anthocyansynthese ausgeübt werden. Zu geringe Konzentration oder völliges Fehlen von Phytochrom wurden diskutiert.

Beteiligung von physikalischen Veränderungen in der Plasmamembran wurden als Grund für die gleichartigen Reaktionen des Gewebes auf die verschiedenen äusseren Reize in Betracht gezogen.

Chemische Veränderung des Nährmediums führte z.T. über eine Veränderung des Stickstoffangebotes zu einer Beeinflussung der PAL-Aktivität. Entzug des Zuckers und Ersatz durch Malat schädigte das Wachstum der Kulturen und brachte die Synthesetätigkeit zum Erliegen. Gibberellinsäure (GA_3) hemmte total die zweite Stufe der Anthocyansynthese und

verminderte die PAL-Synthese während der Blaulicht-Bestrahlung um ca. 35 %.

Hemmversuche mit Actinomycin D und Puromycin zeigten, dass es sich bei der Aktivitätssteigerung der PAL nach äusserem Reiz um eine de-novo Enzym-Synthese handelte. Ein inaktivierendes System konnte nicht nachgewiesen werden. Die Michaelis-Konstante von PAL wurde mit $3,5 \times 10^{-4}$M bestimmt.

Nach Disc-elektrophoretischer Trennung der Proteine im Gewebehomogenisat sind keine Isozyme sondern nur eine Bande mit PAL-Aktivität festgestellt worden.

LITERATURVERZEICHNIS

Amrhein, N. (1969): Beiträge zur Regulation der Flavonoidsynthese in Fagopyrum esculentum Moench. Dissertation der Naturwiss. Fak. Univ. München.

-------, und Zenk, M.H. (1969): NIH-shift bei der in vitro und in vivo Bildung hydroxylierter Zimtsäurederivate in Buchweizenhypocotylen. Phytochemistry 8, 107.

---,--- (1970 a): Concomitant Induction of PAL and Cinnamic acid-4-Hydroxylase during illumination of excised buckwheat hypocotyls. Naturwiss. 57, 312.

---,--- (1970 b): Aktivität der Phenylalaninammoniumlyase (PAL) und Akkumulation von phenylpropanoiden Verbindungen während der Keimung von Buchweizen (Fagopyrum esculentum Moench) im Dunkeln. Z. Pflanzenphys. 63, 384-388.

Andersen, J.W. und Rowan, K.S. (1967): Extraction of soluble leaf enzymes with thiols and other reducing agents. Phytochemistry 6, 1047-1056.

Arnold, A. (1962): zitiert in Siegelman: Physiological Studies on Phenolic Biosynthesis. Biochem.of Phenolic Compounds Ed.: Harborne 437-456 (1964).

von Ardenne, R. (1965): unveröffentlicht.

-------, (1965): Bestimmung der Natur der Anthocyane in Gewebekulturen von Haplopappus gracilis. Z. Naturforsch. 20 b, 186-187.

Attridge, H.T. und Smith, H. (1967): A phytochrome mediated increase in the level of phenylalanine ammonia-lyase activity in the terminal buds of Pisum sativum. Biochim. Biophys. Acta 148, 805-807.

Bachelard und Stowe (1962): A possible link between root initiation and anthocyanin formation. Nature (London) 194, 209-210.

Beilstein: Handbuch der org. Chemie, Phenolcarbonsäuren, Hauptwerk Band 9, Julius Springer Verlag, Berlin 1934.

Bellini, E. und van Poucke, M. (1970): Distribution of Phenylalanine Ammonia-lyase in Etiolated and Far-red Irradiated Radish Seedlings. Planta (Berlin) 93, 60-70.

Blauw, O.H. (1961): The Influence of Blue, Red and Far-red Light on Geotropism and Growth of the Avena Seedling. Acta Bot. Neerl. 10, 397-450.

Bock, G. und Haupt, W. (1961): Die Chloroplastenvermehrung bei Mougeotia III. Die Frage nach der Lokalisierung des Hellrot-Dunkelrot-Pigment-Systems in der Zelle. Planta (Berlin) 57, 518.

Boehringer: Bestimmung der MDH-Aktivität. Biochemica Katalog 1969.

Briggs, W.R., Zollinger, W.D. und Platz, B.B. (1968): Some Properties of Phytochrome Isolated from Dark-grown Oat Seedlings (Avena sativa L.) Plant Physiol. 43, 1239-1243.

Butler, W.L., Lane, H.C. und Siegelman, H.W. (1963): Non-photochemical Transformations of Phytochrome in vivo. Plant Physiol. 38, 514-519.

Cheng, C.K.G. und Marsh, H.V. (1968): Gibberellic acid-promoted lignification and phenylalanine ammonia-lyase activity in a dwarf-pea (pisum sativum). Plant Physiol.43, 1755-1759.

Chorney, W. und Gordon, S.A. (1966): Action spectrum and characteristics of the light activated disappearance of phytochrome in oat-seedlings. Plant Physiol. 41, 891-896.

Cleghorn, R.A. und Jendrassik, L. (1934): Biochem. Z. 274, 189; zitiert in: Vorschriften zum Eppendorf Photometer.

Davis, B. (1964): Disc-Electrophoresis Part II. Ann. N.Y. Accad. Sci. 121, 404.

De Stevans, G. und Nord, F.F. (1955): Natural Phenylpropane Derivates in: Paech, Tracey Mod. Meth.d.Pfl.analyse III, 392 Springer Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg.

Downs, R.J. und Siegelman, H.W. (1963): Photocontrol of Anthocyanin Synthesis in Milo Seedlings (Sorghum vulgare) Plant Physiol. 38, 25-30.

Durst, F. (1969): Persönliche Mitteilung (-Strassburg 1969).

-------, und Mohr, H. (1966 a): Phytochrome-mediated Induction of Enzyme Synthesis in Mustard Seedlings (Sinapis alba L.) Naturwiss. 53, 531-532.

---,--- (1966 b): Half-life of Phytochrome-induced Phenylalanine Deaminase in Mustard Seedlings (Sinapis alba L.) Naturwiss. 53, 707.

Eberhardt, F. (1954): Über die Beziehungen zwischen Atmung und Anthocyansynthese. Planta (Berlin) 43, 253-287.

-------, (1959): Über die Beziehungen zwischen Anthocyanbildung und Stickstoffumsatz. Planta (Berlin) 53, 334-338.

Engelsma, G. (1965): Photo-induced hydroxylation of cinnamic acid in gherkin hypocotyls. Nature 208, 1117-1119.

-------, (1966): The influence of light of different spectral regions on the synthesis of phenolic compounds in gherkin hypocotyls in relation to photomorphogenesis III. Hydroxylation of cinnamic acid. Act. Bot. Neerl. 15, 394-405.

-------, (1967): Photoinduction of Phenylalanine Deaminase in Gherkin Seedlings I. Effect of Blue Light. Planta (Berlin) 75, 207-219.

-------, (1968): The influence of light of different spectral regions on the synthesis of phenolic compounds in gherkin seedlings, in relation to photomorphogenesis V. The temperature dependence. Act. Bot. Neerl. 17, 499-505.

-------, (1969): Low-temperature dependent development of phenylalanine ammonia-lyase in gherkin hypocotyls. Naturwiss. 55, 563.

-------, (1970): A comperative investigation of the control of PAL activity in gherkin and red cabbage hypocotyls. Act. Bot. Neerl. 19, 403-415.

-------, und Meyer, G. (1965): The influence of light of different spectral regions on the synthesis of phenolic compounds in gherkin seedlings in relation to photomorphogenesis. Act. Bot. Neerl. 14, 54-72.

Etzold, H. (1965): Der Polartropismus und Phototropismus der Chloronemen von Dryopteris filix mas (L.) Schott. Planta (Berlin) 64, 254-280.

Furuya, M. und Thimann, K.V. (1964): The Biosynthesis of Anthocyanines XI. Effects of Gibberellic Acid in two Species of Spirodela. Arch. Biochem. Biophys. 108, 109-116.

Galston, A.W. (1969): Flavonoids and Photomorphogenesis in Peas. In: Perspectives in Phytochemistry. J.B. Harborne und T. Swain eds. Academic Press N.Y.193-204.

Gamborg, O.L. (1966): Aromatic Metabolism in Plants II. Enzymes of the shikimate pathway in suspension cultures of plant cells. Can. J. Biochem. 44, 791-799.

-------, Miller, R.A. und Ojima, K. (1968): Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exptl. Cell Res. 50, 151-158.

Geissmann, T.A. (1955): Anthocyanins, Chalcones, Aurones, Flavones, and Related Water-soluble Plant Pigments. In: Mod. Meth. d.Pfl. Analyse III. 451. Peach, Tracey ed. Springer Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg.

Govindarajan, V.S. und Mathew, A.G. (1965): Anthocyanidins from Leucoanthocyanidins. Phytochem. 4, 985.

Grill, R. (1965): Photocontrol of anthocyanin formation in turnip seedlings I. Demonstration of phytochrome action. Planta (Berlin) 66, 293-300.

-------, und Vince, D. (1965): Anthocyanin formation in turnip seedlings. Evidence for two light steps in the biosynthesis pathway. Planta (Berlin) 63, 1-12.

Hanson, K.R. und Zucker, M. (1963): The biosynthesis of chlorogenic acid and related conjugates of the hydroxycinnamic acids. Chromatographic separation and characterization J. Biol. Chem. 238, 1105-1115.

Harraschain, H. und Mohr, H. (1963): Der Einfluss sichtbarer Strahlung auf die Flavonoidsynthese und Morphogenese. Z. Bot. 51, 277.

Hartmann, K.M. (1966): A general hypothesis to interpret "high energy phenomena" of photomorphogenesis on the basis of phytochrome. Photochem. Photobiol. 5, 349-366.

---,--- zitiert in: P. Schopfer, Experimente zur Pflanzenphysiologie, Rombach-Paperback, Freiburg 1970.

Haupt, W. (1968): Die Orientierung der Phytochrom-Moleküle in der Mougeotiazelle: Ein neues Modell zur Deutung der experimentellen Befunde. Z.Pflanzenphysiol. 58, 331-346.

Havir, E.A. und Hanson, K.R. (1968 a): L-Phenylalanine ammonia-lyase I. Purification and molecular size of the enzyme from potato tubers. Biochemistry, 7, 1896-1903.

---,--- (1968 b): L-Phenylalanine ammonia-lyase II. Mechanism and kinetic properties of the enzyme from potato tubers. Biochemistry 7, 1904-1914.

Heath, O.V.S. und Vince, D. (1962): Some non-photosynthetic effects of light on higher plants with special reference to wavelength. Symp. Soc. Exptl. Biol. 16, 110-137.

Hertel, R. (1970): Lichtwachstumsreaktion, Phototropismus. Biolog. Kolloquium Univ. Freiburg Nov. 1970.

Hess, D. (1968): Substratinduktionen durch Zimtsäuren als physiologischer Mechanismus bei der Einleitung der Anthocyansynthese. Z. Pflanzenphysiol. 59, 293-296.

Hinsberg und Lang (1951): In: Medizinische Chemie München Berlin 1951.

Jacob, F. und Monod, J. (1961): Genetic Regulatory Mechanisms in the Synthesis of Proteins. J. molec. Biol.3,318-356.

Jaffe, M.J. und Galston, A.W. (1967): Physiological Studies on Pea Tendrils III, ATPase Activity and Contractility Associated with Coiling. IV. Flavonoids and Contact Coiling. Plant Physiol. 42, 845-850.

Kandeler, R. (1960): Über die Lichtabhängigkeit der Anthocyanbildung. Flora (Jena) 149, 487-519.

Koukol, J. und Conn, E.E. (1961): The metabolism of aromatic compounds in higher plants IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of Hordeum vulgare. J. Biol. Chem. 236, 2692-2698.

Lackmann, I. (1968): Anthocyanbildung in Gewebekulturen und Keimlingen von Haplopappus gracilis und ihre Abhängigkeit vom Licht. Diss. Math. Nat. Fak. F.U. Berlin.

Levy, C.C. und Zucker, M. (1960): Cinnamyl and p-coumaryl esters as intermediates in the biosynthesis of chlorogenic acid. J. Biol. Chem. 235, 2418-2425.

Lineweaver und Burk, (1943): J. Am. Chem. Soc. 56, 618; zitiert in: Biochem. Taschenbuch, H.M. Rauen, Springer Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg 1964.

Marsh, H.V., Havir, E.A. und Hanson, R.H. (1968): L-Phenylalanine Ammonia-lyase III. Properties of the Enzyme from Maize Seedlings. Biochemistry 7, 1915-1918.

Michaelis, L. und Menten, M. (1913): Biochem. Z. 49, 333; zitiert in: Biochem. Taschenbuch, H.M. Rauen, Springer Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg 1964.

Minamikawa, T. und Uritani, I. (1964): Phenylalanine deaminase and tyrosine deaminase in sliced or black rot infected sweet potato roots. Arch. Biochem. 108, 573-574.

---,--- (1965): J. Biochem. (Tokyo) 57, 678.

Mohr, H. (1957): Der Einfluss monochromatischer Strahlung auf das Längenwachstum des Hypokotyls und auf die Anthocyanbildung bei Keimlingen von Sinapis alba L. Planta (Berlin) 49, 389-405.

-------, und van Nes, E. (1963): Der Einfluss sichtbarer Strahlung auf die Flavonoidsynthese und Morphogenese der Buchweizenkeimlinge (Fagopyrum esculentum Moench.)I. Die Synthese von Anthocyan. Z. Bot. 51, 1-16.

Murashige, T. und Skoog, F. (1962): A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Culture. Physiologia Plantarum 15, 473-497.

Münzel, E. (1969): Einfluss von Wuchsstoffen auf die Regeneration an Blattstücken von Begonia rex Putzey. Diss. Mat. Nat. Fak. F.U. Berlin.

Nitsch, C. und Nitsch, J.P. (1966): Effet de la lumière sur l'induction de la phénylalanin-desaminase dans les tissues de tubercule d'helianthus tuberosus L. L.C.R. Acad. Sci. (Paris), 262, 1102-1105.

Ornstein, L. (1964): Disc-Electrophoresis Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 321-349.

Pätau, K. (1943): Zur statistischen Beurteilung von Messreihen (eine neue t-Tafel). Biol. Z. Bl. 63, 152-168.

Reich, E., Franklin, R.M., Shatkin, A.J. und Tatum, E.L. (1961): Effect of Actinomycin D on Cellular Nucleic Acid Synthesis and Virus Production. Science (N.Y.) 134, 556-557.

-------, Cerami, A. und Ward, D.C. (1967): Actinomycin. In: Antibiotics I. 714-725 ed: Gottlieb und Shaw, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, N.Y.

Reid, P.D. und Marsh, H.V. (1969): Gibberellic Acid Promoted Activity of L-Phenylalanine Ammonia-Lyase in Several Plant Species. Z. Pflanzenphysiol. 61, 170-172.

Reinert, J. und White, P.R. (1956): The cultivation of tumor tissues and normal tissues of Picea glauca. Physiologia Plantarum 9, 177-189.

-------, und Torrey, A. (1961): Über die Kultur von Geweben aus Haplopappus gracilis. Naturwiss. 48, 132-133.

-------, Clauss, H. und von Ardenne, R. (1964): Anthocyanbildung von Haplopappus gracilis in Licht verschiedener Qualität. Naturwiss. 51, 87.

Robinson, G.M. und Robinson, R. (1931): Biochem. J. 25, 1687-1705, zitiert in:Mod. Meth. d. Pfl. Analyse III(1955)

Rubery, P.H. und Fosket, D.E. (1969): Changes in PAL-Activity during Xylem Differentiation in Coleus and Soybean. Planta (Berlin) 87,54-62.

Scherf, H. und Zenk, M.H. (1967 a): Induction of anthocyanin and phenylalanine ammonia-lyase formation by a high energy light reaction and its control through the phytochrome system. Z. Pflanzenphysiol. 56, 203-206.

---,--- (1967 b): Einfluss des Lichts auf die Flavonoidsynthese und die Enzyminduktion bei Fagopyrum esculentum. Z. Pflanzenphysiol. 57, 401-418.

Siegel, S.M. und Porto, F. (1963): Oxidants, Antioxidants, and Growth Regulation. In: Plant Growth Regulation 341-353, ed: Iowa State University Press, 1963.

Siegelman, H.W. und Hendricks, S.B. (1957): Photocontrol of anthocyanin formation in turnip and red cabbage seedlings. Plant Physiol. 32, 393-398.

---,--- (1958): Photocontrol of anthocyanin synthesis in apple skin. Plant Physiol. 33, 185-190.

Spruit, C.J.P. (1966): Photoreversible pigment transformations in etiolated plants. Biochim. Biophys. Acta 112, 186-188.

Stafford, H.A. (1965): Flavonoids and Related Phenolic Compounds Produced in the First Internode of Sorghum vulgare Pers in Darkness and in Light. Plant Physiol. 40, 130-138.

Sugano, N. und Hayashi, K. (1967 a): Dynamic interrelation of cellular ingredients relevant to the biosynthesis of anthocyanin during tissue culture of carrot aggregen. Studies on anthocyanins LVII. Bot. Mag. Tokyo 80, 440-449.

---,--- (1967 b): Possible Scheme for the Biosynthesis of Anthocyanin and Phenolic Compounds in a Carrot Aggregen as Indicated by Tracer Experiments. Studies on Anthocyanins LVIII. Bot. Mag. Tokyo 80, 481-486.

Tanada, T. (1968): A rapid photoreversible response of barley root tips in the presence of 3-indole-acetic acid. Proc. Nat. Acad. Sci. (US) 59, 376-380.

Tazawa, M., und Reinert, J. (1969): Extracellular and Intracellular Chemical Environments in Relation to Embryogenesis in vitro. Protoplasma 68, 157-173.

Thorpe, T.A. und Murashige, T. (1968): Starch accumulation in shoot-forming tobacco callus cultures. Science 160, 421-422.

Weidner, M., Rissland, L., Lohmann, L., Huault, C. und Mohr, H. (1969): Die Regulation der PAL-Aktivität durch Phytochrom in Senfkeimlingen (Sinapis alba L.) Planta (Bln) 86, 33-41.

White, M.L. (1960): Porengrösse von Acrylamidgelen. J. Phys. Chem. 64, 1563.

Wilkins, M.B. und Goldsmith, M.H. (1964): The Effects of Red, Far-red and Blue Light on the Geotropic Response of Coleoptiles of Zea mays. J. Exptl. Bot. 15, 600-615.

Zucker, M. (1963): The influence of light on synthesis of protein and chlorogenic acid in potato tuber tissue. Plant Physiol. 38, 575-58o.

-------, (1965): Induction of Phenylalanine Deaminase by Light and its Relation to Chlorogenic Acid Synthesis in Potato Tuber Tissue. Plant Physiol. 40, 779-784.

-------, (1969): Induction of PAL in Xanthium Leaf Discs. Photosynthetic Requirement and Effect of Daylength. Plant Physiol. 44, 912-922.

-------, und Levy, C.C. (1959): Some factors which affect the synthesis of chlorogenic acid in discs of potato tubers. Plant Physiol. 34, 1o8-112.

Die vorliegende Arbeit wurde von November 1967 bis Januar 1971 in der WE Botanik II (Pflanzenphysiologisches Institut) des Fachbereichs 23 (Biologie) der Freien Universität Berlin auf Anregung von Herrn Prof. Dr. J. Reinert durchgeführt, dem ich an dieser Stelle für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und das Interesse am Fortgang der Arbeit danke. Herrn Prof. Dr. H. Clauss danke ich für anregende Diskussionen und Herrn Prof. Dr. O. Gamborg (Saskatoon) für die Überlassung von Suspensionskulturen.

LEBENSLAUF

Am 24. Oktober 1941 wurde ich, Heinz-Detlef G r e g o r als Sohn des Lektors Josef Gregor und seiner Ehefrau Elfride, geb. Nicolaus in Berlin-Lichterfelde geboren.

Von 1947 bis 1953 besuchte ich die 13. Grundschule in Berlin-Lichterfelde und anschliessend das Arndt-Gymnasium in Berlin-Dahlem, wo ich im März 1960 die Reifeprüfung bestand.

Von 1960 bis 1962 absolvierte ich in Berlin-Steglitz mein Apothekenpraktikum,das ich im März 1962 mit dem Vorexamen abschloss.

Im SS 1962 begann ich an der Phil. Theol. Hochschule in Passau mit dem Studium der Pharmazie. Im SS 1963 wechselte ich zur F.U. Berlin, wo ich im Mai 1966 das Staatsexamen in Pharmazie ablegte. Nach Ableistung der Kandidatenzeit in Neumünster (Schleswig-Holstein) kehrte ich nach Berlin zurück, erhielt hier meine Approbation und bin seit WS 1967/68 Doktorand am Pflanzenphysiologischen Institut. Neben meiner Doktorarbeit war ich als Hilfsassistent, Assistent mdWb und schliesslich seit November 1969 als Wiss. Assistent am Institut tätig.

Meine akademischen Lehrer waren vor allem Professor Dr. Reinert, Professor Dr. Eckardt (Botanik); Professor Dr. Jahr, Professor Dr. Manecke und Priv.-Doz. Dr. Vogel (Chemie); Professor Dr. Schenck, Professor Dr. Eiden (Pharmazeutische Chemie); Professor Dr. Hänsel (Pharmakognosie); Professor Dr. Frömming (Galenik); Professor Dr.Schmidt (Mikrobiologie);und Professor Dr. Eser (Physik).